

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**OBTENCIÓN DE CLORHIDRATO DE GLUCOSAMINA  
A PARTIR DE QUITINA**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO POR:

**Br. Selene María Arias Beteta**

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

**INGENIERO QUÍMICO**

TUTOR:

**LicEng. Martha Benavente**

Managua, Nicaragua, Mayo 2014.

A DIOS Y A MI FAMILIA

## AGRADECIMIENTOS

A Dios primero, por brindarme la oportunidad de prepararme académicamente, y asimismo haberme provisto de las personas adecuadas en este trayecto.

A toda mi familia, muy especialmente a mis padres Selene Beteta y Efraín Arias, quienes constantemente motivan mi superación personal. A mi tía Esmeralda Beteta, por su apoyo incondicional y a mis padrinos Adolfo Beteta y Lawrence Meylan, que sin su valioso aporte en mis estudios, no hubiera terminado mi carrera. A Yickssal, a mis dos hermanos, Xóchilt y Efraín Arias, a mis primos, y demás tíos, por su apoyo incondicional y desinteresado.

A mi inigualable tía Tania Beteta (QEPD), quien es un ejemplo de Emprendimiento, Fortaleza, Enfoque y Superación Personal.

A mi tutora, LicEng. Martha Benavente por haber confiado en mi persona el desarrollo del presente trabajo de Investigación, así como también al proyecto UNI-SAREC, quien proporcionó los fondos necesarios para la realización del mismo.

A la PhD Indiana García y al MEng. Dennis Escorcía, quienes me brindaron toda la colaboración necesaria en la realización de las prácticas de laboratorio.

¡Muchas Gracias!

## OPINION DEL CATEDRATICO GUIA

El trabajo de Diploma titulado "*Obtención de Clorhidrato de Glucosamina a partir de Quitina*", realizado por la bachillera **Selene María Arias Beteta**, es un valioso aporte en el estudio y desarrollo de nuevos productos a partir de desechos de la industria pesquera, siendo una opción innovadora a una problemática ambiental.

La realización de este trabajo pretende establecer la posibilidad de utilizar el caparazón de camarón como una fuente de materia prima para la producción de clorhidrato de glucosamina, una sustancia ampliamente utilizada en la industria farmacéutica por proveer ventajas a la salud ya que es un producto natural ampliamente consumido para el tratamiento de las osteoartritis.

En el desarrollo de este estudio, la bachillera **Selene María Arias Beteta** demostró perseverancia, una gran capacidad de trabajo, independencia, buena organización, responsabilidad y destreza en la resolución de problemas de carácter práctico, logrando con ello obtener excelentes resultados.

Como catedrático guía considero que este trabajo cumple con la calidad técnica y científica requerida, por lo que solicito a los honorables miembros del tribunal examinador evaluar el gran esfuerzo desarrollado y otorgar a la bachillera **Selene María Arias Beteta** el título de Ingeniero Químico.

LicEng. Martha Benavente  
**Docente Titular**

## RESUMEN

Con la realización de este estudio se pretendió aprovechar los desechos de crustáceos para la obtención de productos de valor comercial como la quitina y la glucosamina y así disminuir el impacto negativo que puedan tener estos residuos en el medio ambiente. Para ello, se estableció un procedimiento para la obtención de Glucosamina por hidrólisis ácida de quitina extraída a partir de desechos de camarón, así como también hacer un análisis químico cuantitativo del producto obtenido, con respecto a un producto referencia.

Las principales etapas para la síntesis de Clorhidrato de glucosamina a partir de la quitina fueron: (i) hidrólisis ácida del polisacárido, (ii) cristalización del producto (con y sin etanol), y (iii) filtración, lavado y secado del producto final a 50°C. La hidrólisis ácida de la quitina se llevó a cabo con ácido clorhídrico 12 M usando la técnica de reflujo a una temperatura de reacción de 100°C, a diferente relación sólido-líquido (1:10, 1:20 y 1:30), tiempo de reacción (15, 30, 45 y 60 minutos), con agitación y sin agitación. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

El tiempo de reacción influye considerablemente en el porcentaje de rendimiento. Los resultados muestran que los porcentajes de rendimiento fueron más altos a los 15 minutos de reacción, con agitación y sin agitación. Por su parte, el parámetro relación sólido-líquido indica que cuando se utiliza agitación, el mayor porcentaje de rendimiento se produce a una relación 1:10 (72% y 80%, sin etanol y con etanol, respectivamente); mientras que cuando no se agita el sistema de reacción, el mayor porcentaje de rendimiento se produce a una relación 1:20 (88% y 84%, sin etanol y con etanol, respectivamente). Los resultados de los experimentos muestran que la agitación en el período de síntesis de clorhidrato de glucosamina y el uso de etanol en la etapa de cristalización, tienen poca influencia en el porcentaje de rendimiento.

El mayor porcentaje de Rendimiento (88%) se obtiene bajo las siguientes condiciones experimentales: tiempo de reacción 15 minutos, relación sólido-líquido 1:20, sin agitación y sin uso de etanol en la etapa de cristalización.

El análisis químico de las muestras de Clorhidrato de glucosamina indica que las concentraciones de iones plomo e iones sulfato están por debajo del límite de detección del equipo, lo que confirma que el producto obtenido a nivel de laboratorio cumple con los parámetros de calidad de la muestra de referencia.

Los espectros FT-IR de las muestras analizadas y de la muestra de referencia son esencialmente idénticos ya que el coeficiente de correlación fue superior al 95% en todas las muestras.

## Tabla de Contenido

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| AGRADECIMIENTOS .....  | 3           |
| OPINION DEL CATEDRATICO GUIA.....                                      | 4           |
| Docente TitularRESUMEN .....   | 4           |
| Listas de Tablas .....   | 8           |
| Listas de Figuras .....  | 9           |
| I. Introducción.....   | 11          |
| II. Antecedentes.....  | 12          |
| III. Justificación .....   | 13          |
| IV. Objetivos.....   | 14          |
| 4.1 Objetivo General .....   | 14          |
| 4.2 Objetivos Específicos.....   | 14          |
| V. Marco Teórico .....   | 15          |
| 5.1 Quitina.....   | 15          |
| 5.1.1 Obtención de quitina.....  | 17          |
| 5.2 Glucosamina .....  | 18          |
| 5.2.1 Generalidades .....  | 18          |
| 5.2.2 N-Acetil-glucosamina.....  | 20          |
| 5.2.3 Sulfato de Glucosamina.....                                      | 21          |
| 5.2.4 Clorhidrato de Glucosamina .....                                 | 22          |
| 5.2.5 Obtención de Clorhidrato de Glucosamina .....                    | 23          |
| 5.3 Cristalización .....   | 24          |
| 5.3.1 La Nucleación.....   | 25          |
| 5.3.2 Crecimiento Cristalino.....                                      | 27          |
| 5.3.3 Influencia del Solvente en el crecimiento de los cristales ..... | 28          |
| VI. Metodología.....   | 29          |
| 6.1 Materiales.....  | 29          |
| 6.1.1 Quitina .....  | 29          |
| 6.1.2 Clorhidrato de Glucosamina comercial .....                       | 29          |
| 6.2 Reactivos .....  | 29          |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 6.2.1  | Ácido clorhídrico concentrado .....  | 29 |
| 6.2.2  | Etanol al 95-96 % .....  | 30 |
| 6.2.3  | Agua desionizada/Agua destilada.....   | 30 |
| 6.2.4  | Soluciones estándar de Plomo (1 a 250 mg/L) .....  | 30 |
| 6.3    | Equipos y Materiales de Laboratorio .....  | 30 |
| 6.4    | Parte Experimental.....  | 31 |
| 6.4.1  | Obtención de Glucosamina.....  | 31 |
| 6.4.2  | Análisis del Clorhidrato de Glucosamina .....  | 33 |
| 6.5    | Diseño Experimental.....   | 33 |
| VII.   | Resultados y Discusión.....  | 36 |
| 7.1    | Evaluación de los Parámetros óptimos para la producción de glucosamina .....                                       | 36 |
| 7.1.1  | Influencia de las variables independientes en el Porcentaje de Rendimiento   | 37 |
| 7.2    | Influencia del Etanol en la Cristalización del Clorhidrato de Glucosamina .....                                    | 38 |
| 7.3    | Caracterización Química del Clorhidrato de Glucosamina .....   | 40 |
| 7.3.2  | Espectros IR del Clorhidrato de Glucosamina producido en el Experimento,<br>con respecto a muestra comercial ..... | 41 |
| VIII.  | Conclusiones.....  | 43 |
| IX.    | Recomendaciones .....  | 44 |
| X.     | Referencias Bibliográficas.....  | 45 |
| ANEXOS | .....  | 49 |

## Listas de Tablas

| No. | Descripción  | Página |
|-----|--|--------|
| 6.1 | Factores en el Diseño Experimental.  | 33     |
| 6.2 | Respuestas y sus unidades.   | 33     |
| 6.3 | Diseño Experimental para el estudio de la obtención de Clorhidrato de Glucosamina a partir de quitina. | 34     |
| 7.1 | Análisis Fisicoquímico de muestras de clorhidrato de glucosamina obtenida a nivel de laboratorio.      | 41     |



## Listas de Figuras

| No. | Descripción  | Página |
|-----|--|--------|
| 5.1 | Estructura molecular de (a) quitina, (b) celulosa y (c) quitosano.   | 16     |
| 5.2 | Esquema general para el aprovechamiento de crustáceos en el desarrollo de aplicaciones a partir de la quitina y subproductos (Lárez, 2006).  | 16     |
| 5.3 | (a) Estructura química de glucosamina y (b) D-glucosamina en polvo.  | 18     |
| 5.4 | Estructura química de (a) N-acetil glucosamina y (b) Sulfato de Glucosamina.   | 20     |
| 5.5 | Estructura química del Clorhidrato de glucosamina.   | 22     |
| 5.6 | Posibles mecanismos de la nucleación (Freixedas <i>et al.</i> , 2000).   | 25     |
| 5.7 | Estructura en la superficie de un cristal en crecimiento (Myerson, 2001).  | 28     |
| 6.1 | Muestra de (a) quitina obtenida a nivel de laboratorio y (b) clorhidrato de glucosamina comercial.   | 29     |
| 6.2 | (a) Envase de ácido clorhídrico concentrado marca Fisher y (b) Envase de etanol al 95 % marca Merck.   | 30     |
| 6.3 | Sistema de Reflujo para la hidrólisis ácida de la quitina..  | 31     |
| 7.1 | Ilustración esquemática del mecanismo de reacción propuesto para (a) la hidrólisis catalizada por ácido del enlace glucosídico en quitina (Edward, 1955) y (b) para la hidrólisis catalizada por ácido del enlace N-acetil (Stryer, 1995). | 36     |
| 7.2 | Porcentaje de Rendimiento del clorhidrato de glucosamina en función del tiempo, a diferentes volúmenes de ácido clorhídrico concentrado por 1 g de quitina: (a) con agitación y (b) sin agitación.   | 37     |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 7.3 | Porcentaje de Rendimiento del clorhidrato de glucosamina en función del tiempo, a diferentes volúmenes de ácido clorhídrico concentrado por gramo de quitina: (a) con agitación y (b) sin agitación; con uso de etanol en el proceso de cristalización. | 39 |
| 7.4 | Fotos de las muestras de clorhidrato de glucosamina obtenidas a nivel de laboratorio y utilizadas para el análisis de plomo, sulfato y Espectrofotometría IR.   | 41 |
| 7.5 | Espectros IR de muestra de clorhidrato de glucosamina (sample 7A) y una muestra de clorhidrato de glucosamina comercial (Reference).  | 42 |

## I. Introducción

Actualmente, la producción pesquera y acuícola ocupa el quinto lugar entre los principales rubros de exportación del país. En los últimos años el cultivo de camarón ha pasado de un experimento a una industria muy importante ya que, de acuerdo a información gubernamental, las exportaciones de camarón dejaron a la nación un total de 80 millones de dólares en el 2009 (CETREX, 2010).

Desde el punto de vista económico esta industria genera ingresos al país; sin embargo, también produce un volumen considerable de residuos ó desechos que, al no ser aprovechados, acrecientan la problemática ambiental. Estos residuos contienen un alto porcentaje de quitina, lo que unido a su lenta capacidad de degradación, ha estimulado una investigación centrada en el estudio de los posibles usos de estos desechos como materia prima para la obtención de compuestos de alto valor añadido a partir de la quitina (Pastor, 2004).

La quitina es un polisacárido natural no tóxico y biodegradable, y es el segundo biopolímero natural más abundante después de la celulosa. El exoesqueleto de los crustáceos es actualmente la principal fuente industrial de biomasa para la producción de quitina ya que contienen entre un 20-35 %, además de pigmentos y proteínas (Gerente *et al.*, 2007). A partir de la quitina se obtienen productos como quitosano y la glucosamina, los cuales presentan numerosas aplicaciones en distintas áreas principalmente en medicina, farmacia, medioambiente, cosméticos e industria alimenticia (Harish *et al.*, 2007).

La Glucosamina ( $C_6H_{13}NO_5$ ) ó 2-Amino-2-desoxi-D-glucosa quitosamina, es un amino azúcar naturalmente presente en el cuerpo humano y un prominente precursor en la síntesis bioquímica de las proteínas glicosiladas y lípidos (CMA, 2010). La acción terapéutica de la Glucosamina, aplicada en osteo-artritis esta siendo estudiada extensivamente, y según estudios de cartílagos es la mejor forma existente, para aumentar la producción de cartílago. Actualmente, se conoce que su uso continuo favorece al alivio de dolor, reparación y reconstrucción de los tejidos dañados. Además, por ser un suplemento natural profiláctico, puede evitar, y asimismo suspender la degeneración de las articulaciones.

La glucosamina puede ser obtenida a partir de muchas fuentes naturales como por ejemplo la quitina o por fermentación de granos de maíz o trigo. Sin embargo, es mucho más efectiva la que proviene de la quitina de crustáceos, ya que se encuentra en forma de sales de Sulfato o HCl lo que incrementa su digestibilidad y asimilación por parte del organismo, haciéndola más efectiva (CebaNatural, 2010). Dependiendo del método de obtención, existen tres formas básicas comercialmente disponibles: N-Acetil Glucosamina, Sulfato de Glucosamina y Clorhidrato de Glucosamina.

Con la realización de este estudio se pretende aprovechar los desechos de crustáceos para la obtención de productos de valor comercial como la quitina y la glucosamina y así disminuir el impacto negativo que puedan tener estos residuos en el medio ambiente. Para ello, se establecerá un procedimiento para la obtención de Glucosamina por hidrólisis ácida de quitina extraída a partir de desechos de camarón, así como también hacer un análisis químico cuantitativo del producto obtenido, con respecto al producto referencia.

## II. Antecedentes

El problema de los desechos de la industria pesquera y camaronera ha conllevado a la realización de investigaciones para la obtención de productos de valor comercial a partir de estos desechos y así, disminuir su impacto en el medio ambiente. Estos estudios se han enfocado en la producción de quitina y sus derivados (Agulló *et al.*, 2004), por sus múltiples aplicaciones en los diferentes sectores industriales y agropecuarios. En la industria farmacéutica ha cobrado mucha importancia la producción de sales de glucosamina. Esta importancia radica principalmente en que estas sales son usadas como suplementos alimenticios ya que se ha comprobado, mediante diferentes estudios, que son efectivas en la construcción y reparación de los cartílagos en las articulaciones (Muzzarelli, 2001; Houpt *et al.*, 1999).

La producción de glucosamina comercialmente disponible, se ha centrado a partir de la hidrólisis ácida de quitina, la cual es extraída principalmente de desechos de crustáceos, ya que éstos se encuentran disponibles en grandes cantidades por la industria pesquera. Diversos estudios se han realizado para optimizar el rendimiento en la producción de sales de glucosamina, donde los parámetros considerados fueron: temperatura de reacción, concentración y volumen de ácido clorhídrico, tiempo de reacción y agitación (Santhosh y Mathew, 2007; Mojarrad *et al.*, 2007; Gandhi y Laidler, 2002; Leite *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1999).

En el área de Ingeniería de Procesos de la FIQ se han llevado a cabo varios estudios dirigidos a la obtención de quitina y quitosano, a partir de desechos de camarón y langostino. En estos estudios, el quitosano se ha utilizado en la adsorción de diferentes iones metálicos, para su aplicación en sistemas de tratamiento de aguas (Benavente, 2008). Con el propósito de producir mayor cantidad de quitina, Hernández y Escorcía (2009) elaboraron una propuesta técnica para la obtención de este biopolímero por extracción química a partir de desechos de caparazones de crustáceos (camarones y langostinos) a nivel de planta piloto.

### III. Justificación

El intenso consumo de cangrejos, camarones y langostinos, entre otros, genera una cantidad considerable de residuos no aprovechados. Según el Centro de Trámites de las Exportaciones (CETREX), Nicaragua exportó 24.8 miles de toneladas métricas de crustáceos en 2009, y los desechos de crustáceos, la materia prima para producir quitina, constituyen aproximadamente del 40-50 % del peso total (Xu *et al.*, 2008), lo cual acarrea problemas relacionados con el medio ambiente, por tratarse de un material de difícil degradación.

Existen innumerables formas de utilización de este residuo, destacándose, como la más prominente, la obtención de quitina y sus derivados. Uno de estos derivados es la glucosamina, el cual es una sustancia ampliamente utilizada en la industria farmacéutica por proveer ventajas a la salud y es el producto natural más consumido en el tratamiento de las osteoartritis.

Por ello, con la realización de este trabajo se pretende establecer la posibilidad de utilizar el caparazón de crustáceos (camarón) como una fuente de materia prima para la producción de clorhidrato de glucosamina, ya que sería una reformadora solución a una parte de la problemática ambiental; así como también, se valora la importancia que en la actualidad tienen la producción y el tratamiento de los residuos agrarios y de los subproductos de las industrias agroalimentarias.

## **IV. Objetivos**

### **4.1 Objetivo General**

Desarrollar un método de obtención de clorhidrato de glucosamina a partir de Quitina proveniente de caparazón de camarón, a nivel de laboratorio.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Establecer los parámetros óptimos (tiempo de reacción, agitación y volumen de reactante) a temperatura constante (100°C), para la producción de clorhidrato de glucosamina a partir de la hidrólisis ácida de la quitina.
- Estudiar el uso de etanol para favorecer la cristalización del clorhidrato de glucosamina a partir de la solución saturada.
- Realizar la caracterización química del clorhidrato de glucosamina producido a nivel de laboratorio.
- Comparar las propiedades químicas del clorhidrato de glucosamina producido con uno comercial.

## V. Marco Teórico

### 5.1 Quitina

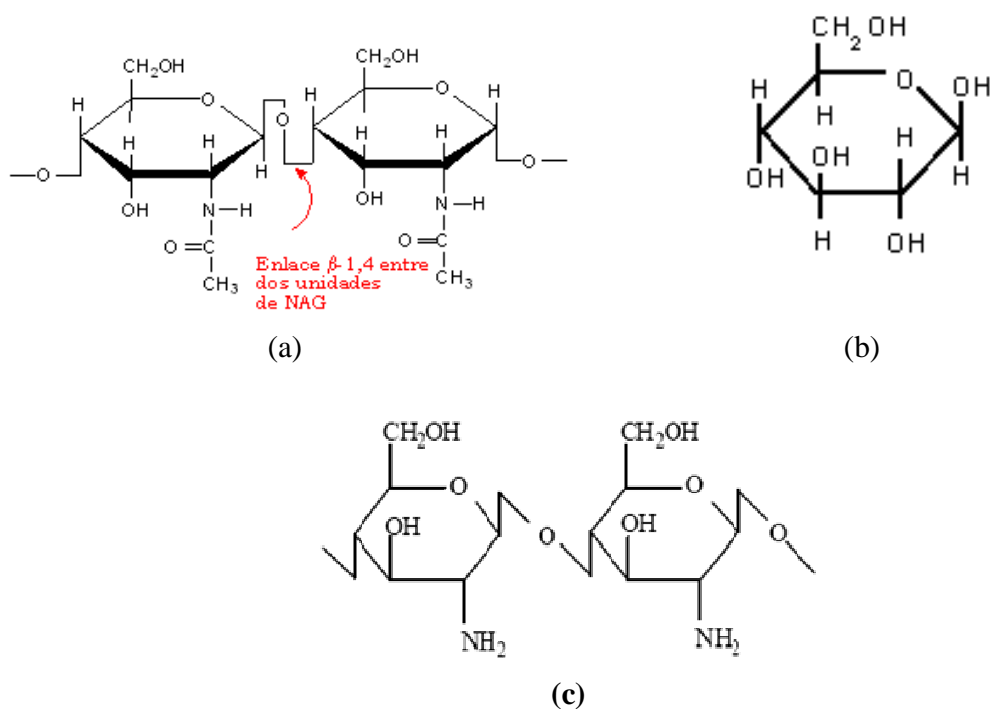
La quitina se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y, después de la celulosa, es el segundo polisacárido en abundancia. Es uno de los componentes principales del exoesqueleto (caparazón) de los artrópodos (arácnidos, crustáceos, insectos) y algunos otros animales (quetas de anélidos, perisarco de cnidarios), paredes celulares de hongos, algas, etc. (Wikipedia, 2010a). La producción industrial de este biomaterial prácticamente se basa en el tratamiento de las conchas de diversos tipos de crustáceos (camarones, langostas, cangrejos y krill), los cuales contienen entre 20 y 35 % de quitina, por la facilidad de encontrar estos materiales como desecho de las plantas procesadoras (Lárez, 2006).

La quitina fue aislada por primera vez por Braconnot en 1811, a partir de hongos superiores, y por su origen la denominó “fungina” (Braconnot, 1811). El nombre quitina – del griego *χιτών* que significa cubierta o envoltura – se debe a Odier, que en 1923 la aisló a partir de escarabajos en soluciones alcalinas (Odier, 1823). Compuesto insoluble en la mayoría de los disolventes comunes, la quitina fue más bien una curiosidad de laboratorio durante muchos años. Sin embargo, en la actualidad, la quitina y sus derivados han pasado a ser polímeros de gran aplicabilidad en los más diversos campos de la actividad humana.

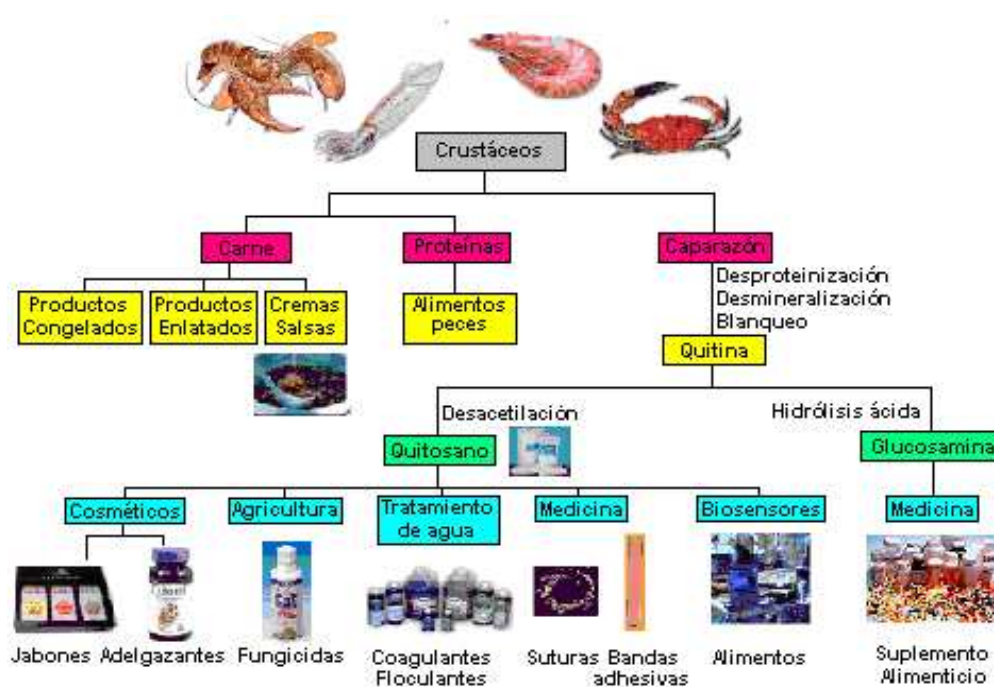
La primera persona que consiguió describir correctamente la estructura química de la quitina fue Albert Hofmann. Es un polisacárido con un alto peso molecular, compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (exactamente N-acetil-D-glucos-2-amina) (Wikipedia, 2010a). Su estructura molecular presenta similitudes con la de la celulosa (ver Fig. 5.1a y 5.1b); la diferencia entre sus cadenas radica en el segundo carbono, el cual presenta un grupo acetamida en la quitina y un grupo hidroxilo en la celulosa (Agulló *et al.*, 2004). Sus moléculas son fibrosas, y logran un material de gran resistencia química y mecánica.

La quitina es usada como agente floculante para tratamiento de agua, como agente para curar heridas, como espesante y estabilizador en alimentos y medicamentos, como resina intercambiadora de iones. Es altamente insoluble en agua y en solventes orgánicos debido a los enlaces de hidrógeno que presenta la molécula (Wikipedia, 2010a). Por hidrólisis básica, la quitina pierde el acetilo del grupo acetyl-amino convirtiéndose en quitosano (desproteización). Mientras que por hidrólisis ácida, se obtiene la glucosamina por el rompimiento de los enlaces  $\beta$ -1,4 entre dos unidades de N-acetilglucosamina. En la Figura 5.2 se muestra un diagrama mostrando el aprovechamiento de los crustáceos y las aplicaciones de sus derivados.

El quitosano (ver Fig. 5.1c), el cual es el producto parcialmente desacetilado de la quitina, se descubrió en el año 1859. Es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) (Wikipedia, 2010b). Presenta una configuración helicoidal tridimensional estabilizada mediante de enlaces de hidrógeno entre los monómeros que lo forman (Andradel *et al.*, 2003).



**Figura 5.1** Estructura molecular de (a) quitina, (b) celulosa y (c) quitosano.



**Figura 5.2** Esquema general para el aprovechamiento de crustáceos en el desarrollo de aplicaciones a partir de la quitina y subproductos (Lárez, 2006).



El quitosano tiene una gran cantidad de aplicaciones comerciales y biomédicas. Se emplea principalmente en la agricultura (protección de semillas, liberación controlada de fertilizantes, funguicidas, etc.), tratamiento de aguas (floculantes, coagulantes, agentes de desmetalización, atrapamiento de colorantes, pesticidas, etc.) medicina (producción de glucosamina, cremas cicatrizantes, terapia génica, etc.), cosméticos (adelgazantes, agente hidratante, aditivo bactericida en jabones, champúes, etc.) y biosensores (para agentes patógenos en alimentos, para especies tóxicas en aguas residuales, etc.) (Lárez, 2006).

### 5.1.1 Obtención de quitina

La quitina comercial se extrae a partir de desechos de crustáceos de la industria pesquera, siendo las principales fuentes los caparazones de cangrejo, camarón, langostino y langosta. Las técnicas de extracción reportadas son muy variadas, pues dependen en gran medida de las características de la fuente y de la composición del material de partida. La mayor parte de las técnicas se han desarrollado en los procesos químicos de hidrólisis de la proteína y la remoción de la materia inorgánica. Algunos incluyen un paso de decoloración de la quitina por extracción con solvente o la oxidación de los pigmentos remanentes. Estos métodos utilizan generalmente grandes cantidades de agua y energía, y con frecuencia dan lugar a desechos corrosivos. En la actualidad se investigan tratamientos enzimáticos como una alternativa promisorio (Beaney *et al.*, 2005).

Dado que los desechos del caparazón de los crustáceos están compuestos por proteínas (20-40 %), sales de calcio y magnesio, mayormente carbonato y fosfato (30-60 %), quitina (20-35 %) y lípidos (0-14 %), la obtención de la quitina por métodos químicos se realiza de acuerdo a los siguientes pasos: descongelado y lavado, trituración, desproteínización, desmineralización y blanqueo. El procedimiento se detalla en el diagrama de bloques mostrado en la Figura A.1 del Apéndice (Hernández y Escorcia, 2009). El procedimiento involucra:

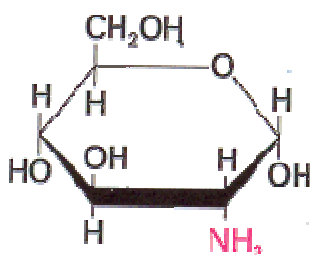
- **Descongelado y Lavado:** En esta etapa se utiliza agua de grifo para descongelar y lavar el material; de esta forma se eliminan los residuos como plásticos, basura y otros.
- **Trituración:** El material es triturado con el propósito de reducir el tamaño del material y así, garantizar una buena desproteínización (etapa siguiente). Posteriormente, el producto es lavado, escurrido y pesado.
- **Desproteínización:** En esta etapa, se agrega NaOH al 10 % al material con el propósito de separar las proteínas del sólido. La mezcla se agita por 1 h a temperatura ambiente y posteriormente, el material sólido es separado de la solución restante y subsiguientemente, se lava con agua del grifo para eliminar los restos de NaOH.
- **Desmineralización:** El residuo sólido es tratado con una solución de HCl para eliminar los minerales de calcio y magnesio. Se deja en reposo a temperatura ambiente por aproximadamente 12 h, para garantizar la remoción de los componentes inorgánicos. Luego, el líquido se separa del sólido y es almacenado, para su posterior tratamiento.

- **Blanqueo:** El sólido obtenido en el paso anterior se trata con una solución de NaClO con agitación por una 1 h para eliminar los pigmentos que le dan el color característico al caparazón de los crustáceos. Posteriormente, el sólido es separado y se lava con agua destilada.
- **Secado:** El sólido obtenido en la etapa de blanqueo se coloca en bandejas de aluminio y se introduce en un horno hasta secar completamente el material a una temperatura entre 60° y 80° C.

## 5.2 Glucosamina

### 5.2.1 Generalidades

La Glucosamina ( $C_6H_{13}NO_5$ ) ó 2-Amino-2-desoxi-D-glucosa quitosamina es un amino azúcar y es uno de los monosacárido más abundante en la naturaleza (ver Fig. 5.3). Se encuentra como componente principal en el esqueleto externo de los crustáceos y artrópodos, y puede ser obtenida a partir de la hidrólisis ácida de la quitina y el quitosano. La glucosamina fue identificada por primera vez en el año 1876 por el Dr. Georg Ledderhose y su estereoquímica fue definida en 1939 por Walter Norman Haworth (Wikipedia, 2010c).



(a)



(b)

**Figura 5.3** (a) Estructura química de glucosamina y (b) D-glucosamina en polvo.

La glucosamina es una sustancia incolora e inodora, de sabor dulce. Es de naturaleza cristalina, tiene un pH ácido, entre 3.5-4.5 y una densidad de 0.75 g/mL. El peso molecular de la glucosamina es de 179.17 g/mol y su punto de fusión es de 150° C (423 K). La rotación específica de la glucosamina es 70° y es soluble en agua. Cuando se calienta por encima de las 80° C, sufre la reacción de Maillard y adquiere un color opaco (Santhosh y Mathew, 2007).

La glucosamina es el bloque fundamental necesario para la biosíntesis de varios tipos de compuestos, que incluyen: glucolípidos, glucoproteínas, glucosalino-glucanos (anteriormente llamados mucopolisacáridos), hialuronato y proteo-glucanos. Como componente de estas macromoléculas, la glucosamina juega un papel esencial en la síntesis de las membranas celulares, tejido conectivo, superficies articulares, tendones, ligamentos, líquido sinovial, piel, uñas, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas y matriz ósea. También es

requerida para la formación de lubricantes y agentes protectores como la mucina y secreciones mucosas respiratorias y digestivas (CMA, 2010).

La glucosamina es un amino monosacárido producido por el organismo por combinación de glutamina con fructosa, a través de la acción enzimática de la glucosamino sintetasa (CMA, 2010). Se elabora naturalmente en forma de glucosamina-6-fosfato, y es un precursor de todos los compuestos nitrogenados que contienen azúcar. De forma específica, la glucosamina-6-fosfato se sintetiza a partir de la fructosa-6-fosfato y la glutamina, como primer paso de la ruta biosintética de las hexosaminas y sus derivados (Wikipedia, 2010c). La glucosamino sintetasa facilita la transferencia de un grupo amida ( $\text{NH}_3$ ) de la glutamina a la fructosa-6-fosfato. La enzima simultáneamente isomeriza este compuesto para formar glucosamina. Luego, la glucosamina es acetilada por la coenzima A, formando N-acetilglucosamina (NAG), que posteriormente se convierte en N-acetilgalactosamina o en N-acetilmanosamina (CMA, 2010). Este producto final se emplea en la elaboración de glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glucolípidos (Wikipedia, 2010c).

La glucosamina se forma de manera natural en nuestro organismo. Sin embargo, la producción de glucosamina en el cuerpo humano disminuye con la edad y su déficit se ha asociado tradicionalmente a la aparición de dolor, especialmente en personas mayores aquejadas de artrosis (Consumer Eroski, 2010). En los últimos años se han publicitado los suplementos de glucosamina administrados como complemento a la dieta diaria para la prevención de dolores articulares provocados por artrosis. Es el producto natural más consumido en el tratamiento de la osteoartritis. También se recomiendan como suplemento para «mantener el colágeno» en piel, cartílagos, ligamentos y tendones. El producto, accesible en distintos formatos, está siendo objeto de estudio para comprobar si realmente proporciona efectos beneficiosos y sobre todo, si puede suponer algún riesgo para la salud (Consumer Eroski, 2010). En una publicación del libro “La Artritis Cure”, el autor, Dr. Jason Theodosakis (cirujano ortopeda), afirma que la suplementación con glucosamina, proporciona un socorro sorprendente para los millones que sufren dolor de artritis crónica (Linoflax, 2010).

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de la glucosamina administrada, estudios en animales sugieren que se utiliza como sustrato para la síntesis de mucopolisacáridos y no como fuente de energía. En los cultivos de condrocitos, la adición de glucosamina estimula la producción de agregano (Vademecun, 2010). El proteoglicano agregano y la proteína colágeno son los componentes clave del cartílago. La triple hélice del colágeno aporta la estructura y la fuerza tensil, mientras que el agregano sirve como absorbente de choques. La proteína componente del agregano es una molécula compuesta de 2397 aminoácidos. La degradación proteolítica del agregano y el colágeno del cartílago puede originar la osteoartritis (Berg *et al.*, 2008).

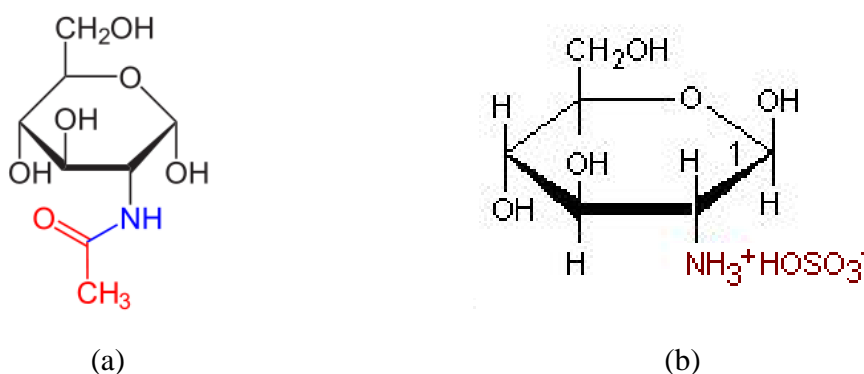
Al comienzo de la osteoartritis, se ha comprobado que se produce un aumento de la producción de colágeno y de agregano, para contrarrestar los efectos destructivos sobre el cartílago de las proteasas estimuladas por las citocinas inflamatorias. Igualmente, se ha observado que los radicales libres acumulados durante el envejecimiento o por el estrés mecánico, reducen la capacidad de los condrocitos para producir cartílago y pueden ser una de las causas de la patogénesis de la osteoartritis. La capacidad de la glucosamina para

estimular la síntesis de los proteoglicanos, explicaría las propiedades anti-inflamatorias moderadas que esta sustancia muestra en la osteoartritis (Vademecun, 2010)

La glucosamina puede ser obtenida a partir de muchas fuentes naturales como, por ejemplo, la quitina o por fermentación de granos de maíz o trigo. Sin embargo es mucho más efectiva la que proviene de la quitina de crustáceos, ya que se encuentra en forma de sales de Sulfato o HCl lo que incrementa su digestibilidad y asimilación por parte del organismo, haciéndola más efectiva (CebaNatural, 2010). Se han descrito formas biodisponibles que se han publicitado como «suplementos dietéticos» destinados a corregir los problemas derivados de su ausencia o mal funcionamiento. Estos productos pueden contener sulfato de glucosamina, hidrocloreto de glucosamina, o N-acetil-glucosamina. Estos diferentes productos químicos tienen algunas similitudes; sin embargo, no puede tener los mismos efectos cuando se toma como un suplemento dietético. La mayor parte de la investigación científica realizada en la glucosamina se ha realizado con sulfato de glucosamina (Webmd, 2010)

### 5.2.2 N-Acetil-glucosamina

También llamada GlcNAc o NAG ó, más exactamente, N-acetil-D-glucosamina, es un derivado de la glucosamina que, a su vez, es un derivado de la glucosa, un monosacárido de seis carbonos (aldohexosa). Químicamente, la N-acetil-glucosamina es un amino azúcar, en el cual el grupo  $-OH$  del carbono 2 del azúcar ha sido sustituido por un grupo  $-NH_2$ , que sufre a su vez una posterior acetilación por incorporación de un grupo acetilo ( $-CO-CH_3$ ) (Ver Fig. 5.4a). (Wikipedia, 2010d).



**Figura 5.4** Estructura química de (a) N-acetil glucosamina y (b) Sulfato de Glucosamina.

La N-acetil-glucosamina suele encontrarse polimerizada formando polisacáridos, principalmente de carácter estructural. Algunas de las moléculas de las que forma parte son (Wikipedia, 2010d):

- La quitina, un polímero compuesto por monómeros de N-acetil-glucosamina que forma parte del exoesqueleto de los artrópodos y de la pared celular de los hongos.
- Algunos glucoesfingolípidos: la N-acetil-glucosamina se halla unida al hidroxilo 1 de la esfingosina, que forma parte de la membrana plasmática. Al igual que otros glúcidos de membrana, la N-acetil-glucosamina interviene en el reconocimiento celular, la adhesión celular y en la recepción de señales químicas.

- El peptidoglucano, un polímero componente de la pared bacteriana.
- Los glucosaminoglucanos, como el ácido hialurónico del tejido conjuntivo.
- Algunas glucoproteínas, también componentes de las membranas celulares, contienen N-acetil-glucosamina unida al grupo amino de la asparagina. Los grupos sanguíneos están en parte determinados por éste y otros glúcidos.

Según los resultados de una evaluación realizada por Muzzarelli (2001), se comprobó que la Poli-N-acetil-glucosamina en la dieta modifica eficazmente el cáncer sérico y la aterosclerosis en los ratones normales y diabéticos, lo que le hace útil para el tratamiento de la hipercolesterolemia en el hombre. Por otra parte, se evidenció que esta sustancia posee propiedades antiulcerosas, antiartríticas, antihipertensivas y antiuricémicas. Estas propiedades están relacionadas con la capacidad para unirse a los ácidos grasos, ácidos biliares (con la consecuente reducción de su reciclado enterohepático), fosfolípidos y ácido úrico.

En pruebas realizadas en el hombre, indican que la Poli-N-acetil-glucosamina controla eficazmente el sobrepeso cuando se asocia con la dieta. Entre otros resultados, se observó que la Poli-N-acetil-glucosamina inhibió la actividad putrefactiva de la flora microbiana intestinal, reduciendo así el riesgo de enfermedad. Además, se reconoce que Poli-N-Acetil-Glucosamina es un compuesto seguro, no tóxico y carente de actividad sobre algunas de las enzimas humanas implicadas en la síntesis de colesterol, como punto diferencial importante con ciertos fármacos. También se han documentado sus acciones inmunopotenciadoras y anticancerosas o antimetastásicas. Por lo tanto, no hay riesgo de sobredosis, no hay efectos secundarios y no hay acción estimulante: Poli-N-Acetil-Glucosamina no es un medicamento, es fácil de usar en caso de sobrepeso y es una sustancia que no provoca adicción (Muzzarelli, 2001).

### 5.2.3 Sulfato de Glucosamina

El sulfato de glucosamina es uno de los derivados de la glucosamina (Ver Fig. 5.4b) y puede ser preparado por hidrólisis ácida de la quitina con ácido sulfúrico concentrado utilizando la técnica de reflujo. Sin embargo, esta reacción tiene un bajo rendimiento y el sulfato de glucosamina, así obtenido, es muy higroscópico y se degrada rápidamente por la acción de la humedad. Para evitar esto, este compuesto se prepara a partir del clorhidrato de glucosamina, añadiendo sulfato de sodio o de potasio y cristalizando la mezcla resultante (Mojarrad, 2007).

Datos bioquímicos y farmacológicos combinados a estudios clínicos en humanos han demostrado que el sulfato de glucosamina es eficaz en el tratamiento de la osteoartritis y otras enfermedades articulares degenerativas; además, controla efectivamente el dolor y detiene o retarda la progresión de la enfermedad. Esto se debe a su habilidad para actuar como un sustrato esencial y estimular la síntesis de glucosaminoglicanos y de la estructura de ácido hialurónico necesario para la formación de proteoglicanos que se encuentran en la matriz estructural de las articulaciones (CMA, 2010). Algunos expertos consideran que también puede favorecer la incorporación de azufre al cartílago (SIIC, 2002). Por otro lado, las investigaciones clínicas y experimentales indican que los fármacos actuales utilizados

para el tratamiento de osteoartritis podrían producir beneficios a corto plazo sobre los síntomas pero de hecho aceleran el proceso de destrucción articular (Pronat, 2010).

El sulfato de glucosamina constituye la piedra angular del abordaje terapéutico de la artrosis (Fuertes, 2010):

- Es altamente soluble al agua, por lo que se absorbe bien por el intestino delgado y atraviesa sin dificultad las barreras biológicas, siendo rápidamente distribuido por los tejidos.
- Es bien absorbido por los cartílagos articulares, que efectúan una captación activa de la molécula.

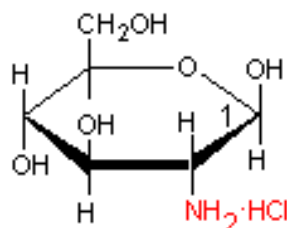
Las ventajas del sulfato de glucosamina son posibles gracias a dos características fundamentales (Fuertes, 2010):

- por un lado, su tropismo especial hacia el tejido cartilaginoso -que lo hace plenamente disponible a nivel articular
- y, por otro, sus reducidas dimensiones moleculares. De hecho gracias a su bajo peso molecular, el sulfato de glucosamina es capaz de atravesar la barrera hematosinovial, difundiéndose en el ambiente microarticular.

La glucosamina es una molécula pequeña (PM 179 g/mol) y muy hidrosoluble, por lo que es absorbida con facilidad por las células intestinales por medio de transporte activo (CMA, 2010). El sulfato de glucosamina administrado por vía oral, es absorbido en el aparato digestivo. Luego se concentra en el hígado, desde donde es incorporado a las proteínas plasmáticas, degradado en moléculas más pequeñas o utilizado para otros procesos biosintéticos. Su eliminación se produce, principalmente, por vía urinaria, con una pequeña proporción eliminada a través de las heces (SIIC, 2002).

#### 5.2.4 Clorhidrato de Glucosamina

Clorhidrato de Glucosamina ó 2-Amino-2-Deoxi-D-Glucose (ver Fig. 5.5) consiste en un polvo blanco cristalino, sabor levemente dulce, fácilmente soluble en agua y poco soluble en etanol (Leite *et al.*, 2002).



**Figura 5.5** Estructura química del Clorhidrato de glucosamina.

El clorhidrato de glucosamina se utiliza para la osteoartritis, el dolor de rodilla, dolor de espalda, glaucoma y pérdida de peso (Webmd, 2010). Es también usado, en combinación con otros productos incluyendo sulfato de chondroitin, sulfato de glucosamina o N-acetil-glucosamina. Sin embargo, ha habido pocos estudios relacionados a la efectividad del clorhidrato de glucosamina en el tratamiento de la osteoartritis. En un estudio realizado por



Haupt *et al.* (1999) se encontró que el suministro de clorhidrato de glucosamina beneficio a algunos pacientes con osteoartritis en la rodilla.

Por otro lado, al comparar el clorhidrato de glucosamina con el sulfato de glucosamina, se llegó a la conclusión que el clorhidrato ofrecía mayores ventajas LFI (2010):

- Tiene la misma eficacia que el sulfato de glucosamina,
- Es más concentrado,
- Contiene sustancialmente menos sodio por dosis efectiva. La forma sulfatada debe ser estabilizada con NaCl y por lo tanto, contiene hasta un 30% de sodio en exceso que el clorhidrato.

### 5.2.5 Obtención de Clorhidrato de Glucosamina

La preparación del clorhidrato de glucosamina a partir de la quitina es una simple reacción de hidrólisis. Durante esta reacción, la quitina es desacetilada y depolimerizada a clorhidrato de glucosamina en presencia de una solución de ácido clorhídrico (Santhosh y Mathew, 2007).

Aunque en forma general, el clorhidrato de glucosamina es una sal preparada por hidrólisis ácida usando ácido clorhídrico, seguido por precipitación, varios autores han reportado diferentes formas de obtención ya sea variando la concentración del ácido clorhídrico, o variando las condiciones del sistema: temperatura, tiempo, sistemas de reacción y dosificación de agentes para purificar el producto. Un estudio realizado por Mojarrad *et al.* (2007) involucró el tratamiento de quitina con ácido clorhídrico a diferentes concentraciones y relación sólido: líquido. La mezcla se agitó y calentó a 100° C por un lapso de tiempo entre 1-4 h. Los resultados mostraron que el rendimiento en la producción del clorhidrato de glucosamina incrementó cuando se incrementó la concentración del ácido, la relación sólido: líquido y el tiempo de reacción. Sin embargo, también se observó que a altas concentraciones de ácidos y largos tiempos de reacción (4 h), disminuye la producción de la sal. Esto puede deberse a las reacciones colaterales, las cuales producen impurezas y por consiguiente, bajan la producción de glucosamina.

En la síntesis de clorhidrato de glucosamina por la hidrólisis ácida de quitina, en un sistema de reflujo con HCl concentrado, Leite *et al.* (2002) encontraron que al variar el tiempo de reacción de 1-4 h, el máximo porcentaje de rendimiento fue en un tiempo de 2 h. Este estudio corrobora lo encontrado por Mojarrad *et al.* (2007), ya que a altos tiempos de reacción utilizando HCl concentrado baja el rendimiento de la sal. Por otro lado, Santhosh y Mathew (2007) indican una manera de recuperar el exceso de ácido clorhídrico por destilación al vacío e incorporan el uso de carbón activado para remover las impurezas y clarificar la solución de clorhidrato de glucosamina con el propósito de incrementar la pureza del producto. Así también, sugieren que la glucosamina cruda puede ser separada del licor madre por la adición de alcohol.

En un trabajo realizado por Lee *et al.* (1999) donde quitosano fue hidrolizado con ácido clorhídrico concentrado para obtener oligómeros de glucosamina, observaron que la adición de carbón activado por 3 h y después removido por centrifugación, fue efectiva para remover las partículas coloreadas. Así mismo, notaron que el almacenamiento de la

solución hidrolizada a baja temperatura ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y la adición de metanol mejoraron notablemente el rendimiento en la precipitación de los oligómeros.

Otras incorporaciones fueron realizadas en la Patente 6486307, por Gandhi y Laidler (2002). En este caso, la quitina fue triturada y el ácido clorhídrico fue precalentado antes de ser adicionado a la quitina. Ellos también utilizaron carbón activado para clarificar la solución hidrolizada, enfriaron la mezcla a temperatura ambiente y lavaron, posteriormente, el sólido con etanol. Con este procedimiento se alcanzó un porcentaje de rendimiento entre 62-67 %, dependiendo de las condiciones de trabajo. El producto obtenido tenía un grado de pureza entre 97-100 %.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, un diagrama del proceso de obtención del clorhidrato de glucosamina a partir de quitina (ver Fig. A.2 del Apéndice) puede seguir los siguientes pasos:

- Trituración de la quitina, para una mejor hidrólisis del material,
- Reacción de hidrólisis ácida con ácido clorhídrico concentrado,
- Adición de Etanol (en el caso que corresponda)
- Precipitación o cristalización a baja temperatura,
- Decantación para obtener el precipitado
- Lavado Etanol, para eliminar impurezas
- Secado del producto a  $50^{\circ}\text{C}$ .

### 5.3 Cristalización

La cristalización representa un proceso vital en muchas ramas de la industria contemporánea (química, farmacéutica, biotecnológica, electrónica); así como en la ciencia (química, química analítica, bioquímica, química biomédica, etc.) (Freixedas *et al.*, 2000)

La cristalización se puede dividir en muchos subgrupos, tales como preparación de cristales individuales (monocristales, cristalización en masa, producción de capa delgadas, cristalización de azúcares, solidificación de metales, biomineralización, etc.), los cuales están gobernados por los mismos principios y procesos: nucleación, crecimiento cristalino, cambios secundarios.

La cristalización es un proceso en el que se realiza un cambio de fase, pasando el sistema de un estado de desequilibrio (desde disolución, estado fundido, etc.) al estado de equilibrio. En este proceso, el sistema incrementa el orden ya que pasa de un sistema relativamente desordenado (la disolución) a un sistema mucho más ordenado (el cristal). Por tanto, de acuerdo con las leyes de la termodinámica, para que el proceso sea espontáneo, debe producirse un descenso de energía que compense el incremento de orden. La teoría actual sobre la formación de cristales indica que éstos se forma a través de dos etapas: la nucleación y el crecimiento cristalino.



### 5.3.1 La Nucleación

La nucleación es la formación de amontonamientos de átomos, moléculas o iones constituyentes de la nueva fase en pequeñas zonas separadas en el interior de la antigua fase. Estos amontonamientos formados por distintas cantidades de partículas se llaman clusters. Posteriormente, algunos de los clusters formados crecen y aumentan su volumen, mientras que otros se desmoronan. Cuando un cluster alcanza una determinada dimensión crítica, entonces inevitablemente aumenta su volumen en el sistema sobresaturado, y con el tiempo alcanza una dimensión macroscópica. La velocidad del cambio dependerá del número de gérmenes capaces de un posterior crecimiento que se forman por unidad de volumen del sistema en el que ocurre la nucleación, y por unidad de tiempo. Esta magnitud se llama velocidad de nucleación (Freixedas *et al.*, 2000).

La descripción teórica de la nucleación depende del mecanismo por el cual los gérmenes de la nueva fase se originan. Los posibles mecanismos de la nucleación se pueden dividir en nucleación primaria y secundaria, según el esquema de la Figura 5.6.

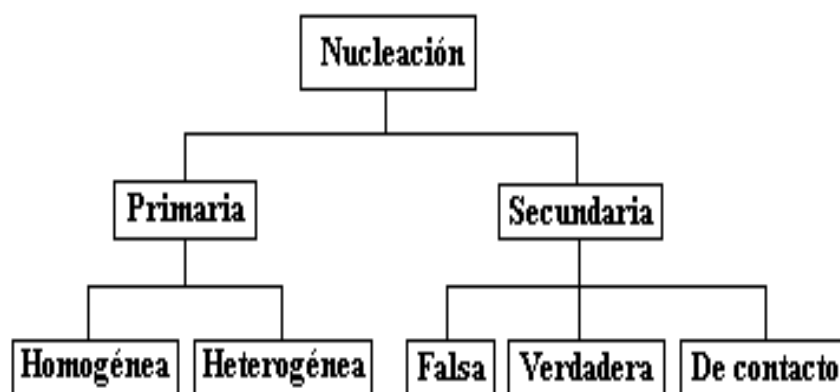


Figura 5.6. Posibles mecanismos de la nucleación (Freixedas *et al.*, 2000).

#### 5.3.1.1 Nucleación Primaria

Es aquella en la que el origen de la nueva fase sólida no está condicionada, ni influida por la presencia de la fase sólida que se origina. Puede tratarse de una disolución libre de cualquier partícula de la fase sólida, o bien de una disolución que contenga únicamente partículas extrañas a la fase sólida que se forma. Ahora bien, si la presencia de partículas extrañas influyen o no en la nucleación, se distinguen dos mecanismos: nucleación heterogénea y homogénea, respectivamente (Freixedas *et al.*, 2000).

Durante la **nucleación homogénea**, el origen de las partículas de la nueva fase no se produce ni está influido por la presencia de ninguna fase sólida en el sistema. Se trata de la nucleación en un sistema que no contiene en absoluto ninguna partícula de la fase sólida. Aunque no se descarta la presencia de partículas de la fase sólida en el sistema, éstas no deben facilitar o condicionar el origen de las nuevas partículas. Aunque la nucleación homogénea no es un mecanismo extendido, ni muy frecuente, se ha estudiado detalladamente. El modelo de la nucleación homogénea, propuesto por Farkas (1927) y perfeccionado por Zeldovich (1943), se basa en que el amontonamiento de átomos o de

moléculas de la nueva fase (cluster) se produce a través de choques graduales de los correspondientes átomos o moléculas individuales, primero entre ellos y más tarde con los cluster ya formados. Los clusters se forman entonces por una serie de reacciones bimoleculares de acuerdo con el esquema,



Los clusters que alcanzan el tamaño crítico aumentarán su tamaño mientras la disolución permanezca sobresaturada. Si el crecimiento continúa durante un tiempo suficiente, estos clusters alcanzan un tamaño macroscópico, es decir, forman cristales visibles.

En el caso de la **nucleación heterogénea**, la nueva fase está condicionada por la presencia en el sistema de una fase sólida extraña (nucleante heterogéneo). La superficie del nucleante heterogéneo facilita la formación de la nueva fase ya que reduce la energía requerida para la nucleación; por tanto actúa como catalizador y facilita la génesis de los gérmenes de la fase en nucleación.

Todos los sistemas, sobre todos los líquidos, contienen partículas extrañas sólidas con un amplio espectro de dimensiones, partículas tales como polvo, partículas de las paredes del recipiente, etc., que son muy difíciles y en muchos casos, imposibles de eliminar del sistema. Por ello, en condiciones normales, si no se emplean medidas especiales, los sistemas con sobresaturaciones menores que las correspondientes al valor crítico para la nucleación homogénea, tendrán tendencia a formar partículas de la nueva fase por nucleación heterogénea.

### 5.3.1.2 La Nucleación Secundaria

Se refiere al proceso por el cual la formación de cristales está condicionado por la presencia de partículas de la misma fase en el sistema sobresaturado y por cuya causa ocurre. Se emplea principalmente en la cristalización de sales muy solubles a partir de disoluciones sobresaturadas. Los posibles mecanismos de la nucleación secundaria se indican en la Figura 3.6 (Freixedas *et al.*, 2000).

Los posibles mecanismos de la Nucleación secundaria falsa involucra: liberación de polvo (dusty breeding), desintegración de agregados (polycrystalline breeding) y macroabrasión. El primer mecanismo se manifiesta generalmente durante la siembra de cristales (seeds) en una disolución sobresaturada. El número de cristales formados es, por regla general, mayor que el número de cristales introducidos. La razón de este fenómeno es la presencia, en la superficie de los cristales introducidos, de partículas microscópicas de la fase sólida que se originaron durante el sacado en la superficie del *seed*, la preparación de *seeds*, etc. Las partículas diminutas son arrastradas hacia la disolución sobresaturada desde la superficie de

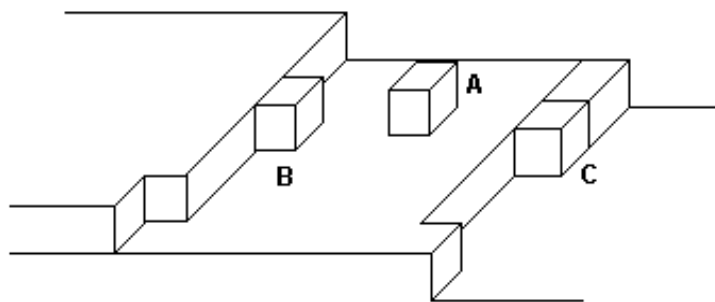
los cristales mayores y al ser mayores que el germen crítico correspondiente a la sobresaturación existente, comienzan a crecer y pueden alcanzar una dimensión observable.

La desintegración de agregados se produce por la inestabilidad de los agregados cristalinos que se originan durante la cristalización a sobresaturación elevada. Los agregados pueden, en una fase posterior, desintegrarse en cristales, por ejemplo por influencia de las fuerzas hidrodinámicas que actúan en una suspensión sometida a agitación, aumentando el número de cristales presentes. Por su lado, la macroabrasión se debe a la acción de las fuerzas mecánicas de mezclado intenso de la suspensión que cristaliza, se produce un redondeamiento de las esquinas y de las aristas de los cristales más grandes. Los fragmentos desprendidos en la disolución sirven como núcleos de nuevos cristales.

En la nucleación secundaria verdadera, los gérmenes de los nuevos cristales se pueden originar en la superficie del cristal en crecimiento, en la capa límite del líquido contiguo al cristal, o en el volumen de la disolución sobresaturada que se encuentra en las cercanías del cristal. Uno de los posibles mecanismos de la nucleación secundaria verdadera se produce por desintegración de dendritas. Cuando los cristales crecen en un medio con una sobresaturación alta, su superficie no se desarrolla uniformemente y pueden originarse dendritas. Debido a la acción, ya sea de las fuerzas hidrodinámicas o de la recristalización espontánea, las dendritas se separan de los cristales y pasan al volumen y pasan al volumen del sistema sobresaturado, donde actúan como centros de cristalización (*dendrite breeding*). Otro mecanismo es el de nucleación vegetativa (*vegetative nucleation*), el cual supone la formación en la capa límite del líquido contiguo al cristal de agrupaciones de moléculas de la fase que cristaliza con una estructura considerablemente ordenada.

### 5.3.2 Crecimiento Cristalino

Puede definirse como la integración ordenada de partículas (átomos, moléculas o agrupaciones) en la superficie de un cristal o de un núcleo cristalino. Cuando se discute el crecimiento de cristales es necesario centrarse en una sola cara o plano y examinar el desarrollo de esa cara. Se ha sugerido que el crecimiento de los cristales se realiza capa por capa. Esto puede comprenderse mirando la Figura 5.7. Una molécula en solución debe desolvatarse y absorberse en la superficie del cristal. En la Figura 5.7 se pueden ver tres posibles sitios para que la molécula se incorpore en la superficie del cristal. Los sitios **A**, **B** y **C** pueden definirse como el número de enlaces que la molécula formará con el cristal. En el sitio **A**, la molécula se adjuntará sólo sobre la superficie (terrazza) de una capa en crecimiento; mientras que en el sitio **B**, la molécula se une a la superficie y al escalón de una capa en crecimiento. En el sitio **C**, la molécula se une a tres superficies en lo que se conoce como sitio de torcedura (Myerson, 2001).



**Figura 5.7** Estructura en la superficie de un cristal en crecimiento (Myerson, 2001).

Desde el punto de vista energético, **C** es más favorable que **B**, y **B** es más favorable que **A**. Se puede generalizar diciendo que las moléculas tienden a enlazarse en sitios donde hay el máximo número de vecinos cercanos. Estos son los sitios más energéticamente favorables. El mecanismo general para la incorporación de una molécula en una cara cristalina es su adsorción sobre la superficie, seguida de su difusión a lo largo de la superficie de una capa (tipo **B**) o torcedura (tipo **C**) para su incorporación. De esta explicación se puede ver porque los cristales crecen capa por capa, ya que es más fácil para las moléculas enlazarse a una capa existente que esta extendida sobre una superficie, que formar una nueva.

### 5.3.3 Influencia del Solvente en el crecimiento de los cristales

El impacto del disolvente sobre la calidad del producto debe ser considerado ya que puede tener un efecto significativo en la estructura y el tamaño de los cristales, la morfología y la pureza. Fundamentalmente, el disolvente puede influir mediante la modificación de las propiedades de la solución (es decir, la densidad, viscosidad, y difusividades de los componentes), la solubilidad del soluto, así como la estructura de la interfaz de cristal-líquido.

Se ha encontrado que el grado de solubilidad del soluto en el disolvente determina la masa (es decir, el rendimiento) de los cristales obtenidos durante el proceso, producto del efecto del solvente en la estructura de interfaz y en el mecanismo de crecimiento (Myerson, 2001).

Otros factores a considerar en la selección de un disolvente incluyen:

- las características del producto, por ejemplo, el nivel de impureza, tamaño de los cristales, morfología y el rendimiento del producto,
- la salud y seguridad, por ejemplo, toxicidad disolvente, inflamabilidad, reactividad química, y el impacto ambiental,
- la economía, por ejemplo, el costo de disolventes, reciclaje y eliminación.

## VI. Metodología

### 6.1 Materiales

#### 6.1.1 Quitina

La quitina fue preparada a partir de la cáscara de camarón a nivel de laboratorio (Figura 6.1a), según el procedimiento establecido por Hernández y Escorcía (2009) (Ver el diagrama de flujos en la Figura A.2.1) y fue suministrada por estos autores para llevar a cabo el presente estudio. La materia prima (desechos de crustáceos de camarón) para la obtención de quitina fue proporcionada por la empresa CAMANICA. S.A., del Grupo PESCANOVA.

#### 6.1.2 Clorhidrato de Glucosamina comercial

El clorhidrato de glucosamina (referencia comercial) se adquirió a través de la Empresa Jining Green Group Co., Ltd., Shandong, China (Ver Fig. 6.1b). En la Tabla A.3.1 del Anexo A.3 se presenta el Certificado de Análisis con las características fisicoquímicas del material.



(a)



(b)

**Figura 6.1** Muestra de (a) quitina obtenida a nivel de laboratorio y (b) clorhidrato de glucosamina comercial.

### 6.2 Reactivos

#### 6.2.1 Ácido clorhídrico concentrado

Para la hidrólisis ácida de la quitina se usó ácido clorhídrico (HCl) con una concentración de 37 %, grado analítico, marca Fisher (ver Fig. 6.2), cuya densidad es de 1.19 Kg/L. A temperatura ambiente, el cloruro de hidrogeno es un gas ligeramente amarillo, muy corrosivo, no inflamable, más pesado que el aire, de olor fuertemente irritante. Cuando se expone al aire, el cloruro de hidrógeno forma vapores corrosivos densos de color blanco. Se emplea comúnmente como reactivo químico y se trata de un ácido fuerte que se disocia completamente en disolución acuosa.



(a)



(b)

**Figura 6.2** (a) Envase de ácido clorhídrico concentrado marca Fisher y (b) Envase de etanol al 95 % marca Merck.

### 6.2.2 Etanol al 95-96 %

El compuesto químico etanol o alcohol etílico se utilizó para incrementar la velocidad de cristalización de la glucosamina producida ya que a pesar de que el etanol es considerado como un buen disolvente, la glucosamina es insoluble en este compuesto. El etanol es un líquido incoloro e inflamable, con un punto de ebullición de 78° C. Puede utilizarse como anticongelante y como desinfectante. Su mayor potencial bactericida se obtiene a una concentración de aproximadamente el 70 %.

### 6.2.3 Agua desionizada/Agua destilada

El agua desionizada y el agua destilada se utilizó para llevar a cabo los experimentos y para preparar las soluciones estándares de iones metálicos a partir de la solución madre. Estos tipos de agua se emplean en el área de la química analítica ya que se necesitan aguas puras libres de iones interferentes.

El agua destilada es aquella a la que se le han eliminado las impurezas e iones mediante destilación. Mientras el agua desionizada o desmineralizada es aquella a la cual se le han quitado los cationes tales como los iones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y otros, y aniones como  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , etc., mediante un proceso de intercambio iónico.

### 6.2.4 Soluciones estándar de Plomo (1 a 250 mg/L)

Estas soluciones se prepararon a partir de una solución estándar de nitrato de plomo II ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) de 1000 mg/L. Para preparar todas las soluciones se utilizó agua desionizada.

## 6.3 Equipos y Materiales de Laboratorio

Los equipos y los materiales que se utilizaron para llevar a cabo el trabajo experimental se muestran en la Tabla A.1.1 y en la Tabla A.1.2 del Anexo, respectivamente.

## 6.4 Parte Experimental

### 6.4.1 Obtención de Glucosamina

El clorhidrato de glucosamina es una de las tres formas básicas de glucosamina comercialmente disponibles y es la forma más pura en comparación con el sulfato de glucosamina y el acetato de glucosamina.

La hidrólisis ácida de la quitina se efectuó por la técnica de reflujo (ver Fig. 6.3) con HCl concentrado. A fin de obtener un rendimiento máximo de clorhidrato de glucosamina, se establecieron las condiciones óptimas de la reacción. Para ello, se consideraron las siguientes variables independientes, las cuales serán controladas durante el proceso:

- Tiempo de reacción
- Con agitación y sin agitación
- Relación sólido-líquido (Quitina-HCl conc.)

El diseño experimental en la Tabla 6.1 muestra los factores o variables independientes que se evaluaron para el estudio de la obtención de clorhidrato de glucosamina a partir de quitina extraída de caparazón de camarón; y la Tabla 6.2 muestra las variables dependientes (respuestas).



**Figura 6.3** Sistema de Reflujo para la hidrólisis ácida de la quitina.



Los pasos a seguir en esta propuesta de síntesis del clorhidrato de glucosamina fueron los siguientes:

#### **6.4.1.1 Acondicionamiento de la materia prima**

En esta etapa se consideró la reducción de tamaño de la quitina, garantizando un tamaño máximo de partícula de 1 mm (malla 20). Para ello, se hizo uso de un procesador de alimentos marca Oster (ver Tabla A.1.1) para triturar la muestra y posteriormente el material triturado se hizo pasar por un tamiz con un diámetro de 0.56 mm para garantizar el tamaño de partícula <1 mm. Con este tamaño de partícula se evita una disolución lenta y carbonización del material durante la reacción de hidrólisis.

#### **6.4.1.2 Hidrólisis Ácida**

La digestión de la quitina se realizó con ácido clorhídrico concentrado en condiciones de reflujo. Se colocó 5 g de quitina pulverizada en un balón, y luego se le añadió el ácido clorhídrico concentrado. La reacción se realizó a temperatura constante (aproximadamente 100° C), durante un tiempo determinado. Las condiciones de trabajo se muestran en la Tabla 6.3. Transcurrido el tiempo estimado, se dejó enfriar la solución lechosa a temperatura ambiente y posteriormente se preservó en un ambiente refrigerado.

#### **6.4.1.3 Cristalización**

La Cristalización es favorecida en condiciones de baja temperatura. Por lo tanto, cada muestra se conservó en refrigeración, a 12° C.

Existen indicios documentados sobre la posibilidad de que la adición de Etanol al 95 % favorezca la rapidez de cristalización y la calidad de los cristales. Por este motivo, a cada una de las muestras obtenidas bajo las distintas condiciones de trabajo, se les agregó un excedente de 10 ml de Etanol al 95%.

Al final de esta etapa, se compararon los porcentajes de rendimiento de las muestras obtenidas, con adición y sin adición de etanol, para determinar la efectividad del uso de etanol.

#### **6.4.1.4 Lavado de los Cristales**

En esta etapa, se separó la solución de ácido clorhídrico mediante decantación del precipitado (cristales de clorhidrato de Glucosamina) y se lavó con etanol al 95 %. No es recomendable diluir el etanol o utilizar etanol de menor concentración, ya que el clorhidrato de glucosamina puede solubilizarse y perderse en el líquido.

#### **6.4.1.5 Secado de los Cristales**

Finalmente los cristales se secaron en un horno a 50° C durante un período determinado, durante el cual las trazas del disolvente se evaporaron.



### 6.4.2 Análisis del Clorhidrato de Glucosamina

Para comprobar que el producto obtenido es clorhidrato de glucosamina se comparó una muestra con una sustancia patrón o de referencia (glucosamina comercial). Así también, se realizaron los siguientes análisis al producto obtenido:

:

- Análisis químicos:
  - Análisis de plomo por Espectrometría de absorción atómica
  - Análisis de sulfato
- Análisis espectrofotométrico:
  - Espectros de absorción en la región de infrarrojo (Equipo FT-IR)

El procedimiento de cada análisis se encuentra en el Anexo A.4.

### 6.5 Diseño Experimental

Para el diseño experimental de este estudio se usó el programa Statgraphics Centurión XV, versión 15.2.06 para Windows. La clase de diseño es Multi-factor categórico. El diseño base considera:

- Número de Factores Experimentales: 3
- Número de Respuestas: 1
- Número de Corridas: 48

La Tabla 6.1 muestra los factores independientes a evaluar para el estudio de la obtención de clorhidrato de glucosamina a partir de quitina. Mientras que la Tabla 6.2 muestra la variable dependiente (respuestas).

**Tabla 6.1** Factores en el Diseño Experimental.

| Factores     | Niveles | Unidades |
|--------------|---------|----------|
| Tiempo       | 3       | Min      |
| Relación S:L | 2       | g:mL     |
| Agitación    | 1       | Si/No    |

**Tabla 6.2** Respuestas y sus unidades.

| Respuestas                | Unidades |
|---------------------------|----------|
| Porcentaje de Rendimiento | %        |

El diseño es un diseño factorial estándar que consiste en todas las combinaciones de los niveles de los factores o variables independientes (Tabla 6.1). En este diseño se obtuvieron un total de 48 corridas las cuales se muestran en la Tabla 6.3.

**Tabla 6.3** Diseño Experimental para el estudio de la obtención de Clorhidrato de Glucosamina a partir de quitina.

| No. Exp. | Temperatura de Reacción (°C) | Tiempo (min.) | Agitación | Relación sólido:líquido (g:mL) |
|----------|------------------------------|---------------|-----------|--------------------------------|
| 1        | 100                          | 15            | Si        | 1:10                           |
| 2        | 100                          | 15            | Si        | 1:10                           |
| 3        | 100                          | 15            | Si        | 1:20                           |
| 4        | 100                          | 15            | Si        | 1:20                           |
| 5        | 100                          | 15            | Si        | 1:30                           |
| 6        | 100                          | 15            | Si        | 1:30                           |
| 7        | 100                          | 30            | Si        | 1:10                           |
| 8        | 100                          | 30            | Si        | 1:10                           |
| 9        | 100                          | 30            | Si        | 1:20                           |
| 10       | 100                          | 30            | Si        | 1:20                           |
| 11       | 100                          | 30            | Si        | 1:30                           |
| 12       | 100                          | 30            | Si        | 1:30                           |
| 13       | 100                          | 45            | Si        | 1:10                           |
| 14       | 100                          | 45            | Si        | 1:10                           |
| 15       | 100                          | 45            | Si        | 1:20                           |
| 16       | 100                          | 45            | Si        | 1:20                           |
| 17       | 100                          | 45            | Si        | 1:30                           |
| 18       | 100                          | 45            | Si        | 1:30                           |
| 19       | 100                          | 60            | Si        | 1:10                           |
| 20       | 100                          | 60            | Si        | 1:10                           |
| 21       | 100                          | 60            | Si        | 1:20                           |
| 22       | 100                          | 60            | Si        | 1:20                           |
| 23       | 100                          | 60            | Si        | 1:30                           |
| 24       | 100                          | 60            | Si        | 1:30                           |
| 25       | 100                          | 15            | No        | 1:10                           |
| 26       | 100                          | 15            | No        | 1:10                           |
| 27       | 100                          | 15            | No        | 1:20                           |
| 28       | 100                          | 15            | No        | 1:20                           |
| 29       | 100                          | 15            | No        | 1:30                           |
| 30       | 100                          | 15            | No        | 1:30                           |
| 31       | 100                          | 30            | No        | 1:10                           |
| 32       | 100                          | 30            | No        | 1:10                           |

|    |     |    |    |      |
|----|-----|----|----|------|
| 33 | 100 | 30 | No | 1:20 |
| 34 | 100 | 30 | No | 1:20 |
| 35 | 100 | 30 | No | 1:30 |
| 36 | 100 | 30 | No | 1:30 |
| 37 | 100 | 45 | No | 1:10 |
| 38 | 100 | 45 | No | 1:10 |
| 39 | 100 | 45 | No | 1:20 |
| 40 | 100 | 45 | No | 1:20 |
| 41 | 100 | 45 | No | 1:30 |
| 42 | 100 | 45 | No | 1:30 |
| 43 | 100 | 60 | No | 1:10 |
| 44 | 100 | 60 | No | 1:10 |
| 45 | 100 | 60 | No | 1:20 |
| 46 | 100 | 60 | No | 1:20 |
| 47 | 100 | 60 | No | 1:30 |
| 48 | 100 | 60 | No | 1:30 |

## VII. Resultados y Discusión

El estudio de la obtención de clorhidrato de glucosamina por la hidrólisis ácida de quitina usando ácido clorhídrico concentrado (12 N), se basó en la evaluación de las variables independientes: tiempo de reacción, relación sólido-líquido y agitación, teniendo como variable de respuesta el porcentaje de rendimiento. Así también, se consideró la influencia que podría tener el uso de etanol durante la etapa de cristalización del producto esperado.

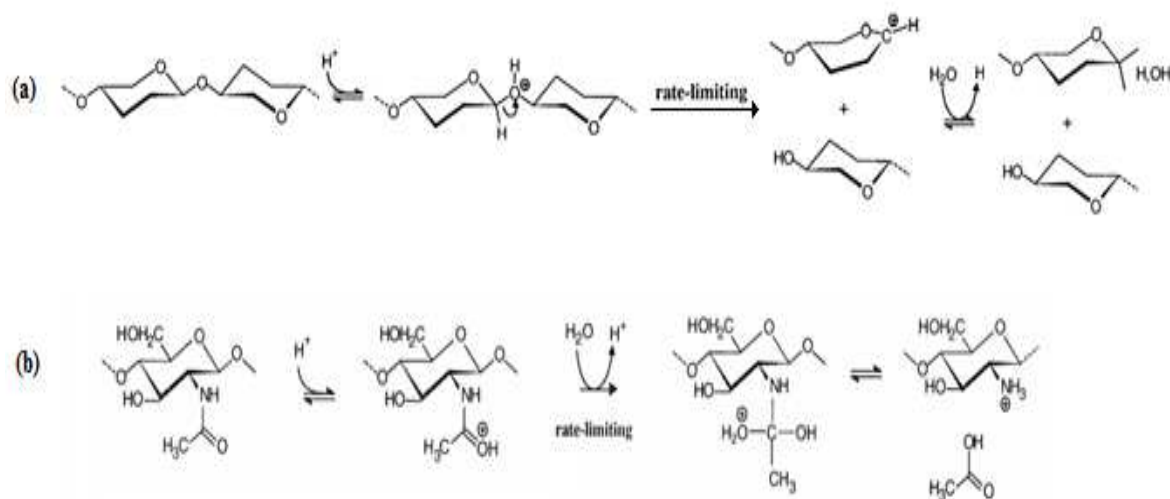
A continuación se detallan los principales resultados y su discusión.

### 7.1 Evaluación de los Parámetros óptimos para la producción de glucosamina

Durante el proceso de la hidrólisis ácida, se observó que:

- La quitina se disolvió completamente en un período entre 3 y 18 minutos, e inmediatamente después la solución se oscurece, adquiriendo un color marrón. Este cambio de color en las soluciones (de incoloro a marrón) puede ser causada por la reacción de Maillard que involucra la reacción de los grupos amino con un aldehído, conduciendo al cambio de color asociado a la hidrólisis de la quitina (Pettersen *et al.*, 2000).
- La reacción de hidrólisis era más rápida cuando la mezcla se agitó a la temperatura de trabajo (100°C).

El proceso de hidrólisis involucra dos reacciones de hidrólisis catalizada por los iones Hidrógeno ( $H^+$ ): (a) en el enlace glucosídico (depolymerización) y (b) en el enlace N-Aceto (deacetilización).

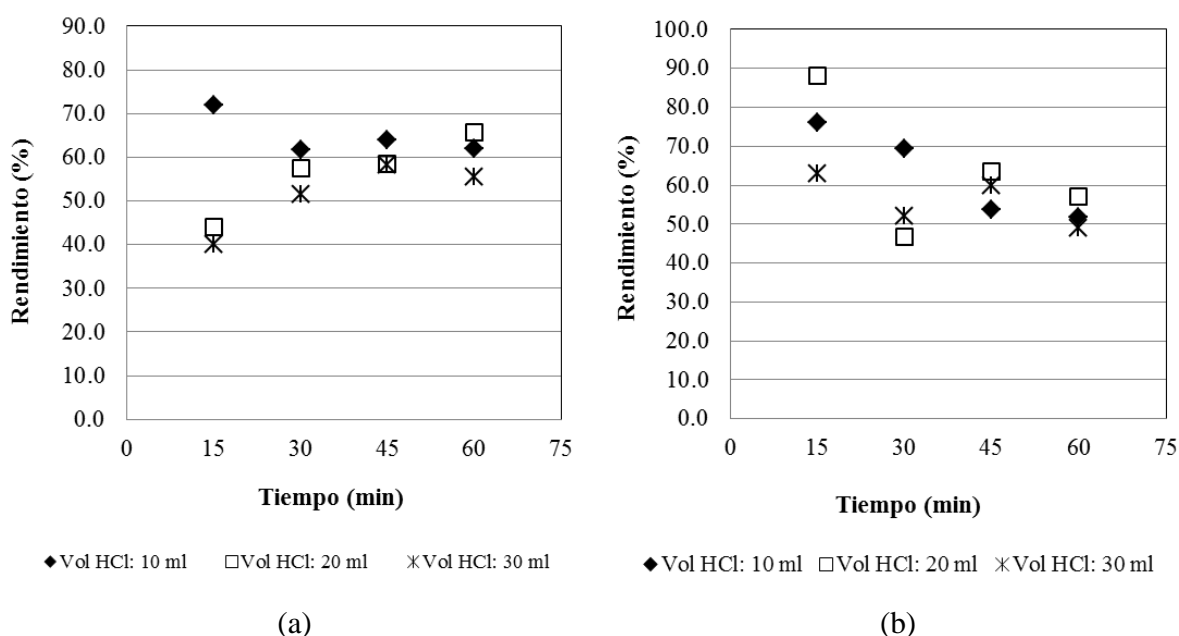


**Figura 7.1** Ilustración esquemática del mecanismo de reacción propuesto para (a) la hidrólisis catalizada por ácido del enlace glucosídico en quitina (Edward, 1955) y (b) para la hidrólisis catalizada por ácido del enlace N-acetil (Stryer, 1995).

Hackman (1962) observó que la mayoría de la degradación de la cadena de quitina ocurrieron durante los primeros pocos minutos y que los productos formados fueron oligosacáridos. La Figura 7.1 ilustra el mecanismo de reacción más aceptada para la hidrólisis catalizada por ácido de un enlace glucosídico (SN1) y el mecanismo de reacción para la hidrólisis catalizada por ácido del enlace N-acetil (reacción SN2).

### 7.1.1 Influencia de las variables independientes en el Porcentaje de Rendimiento

Para el análisis del comportamiento del Rendimiento en función del tiempo, se contemplan las variables agitación y relación líquido-sólido (ml de HCl concentrado por gramo de quitina). En este caso no se considera el efecto del uso de etanol en la recristalización del clorhidrato de glucosamina. En la Tabla A.4.1 se presentan los resultados del porcentaje de rendimiento de la obtención del clorhidrato de glucosamina a partir de quitina. En la Figura 7.2 se muestra de manera gráfica el promedio de los resultados obtenidos durante el proceso de obtención del clorhidrato de glucosamina.



**Figura 7.2** Porcentaje de Rendimiento del clorhidrato de glucosamina en función del tiempo, a diferentes volúmenes de ácido clorhídrico concentrado por 1 g de quitina: (a) con agitación y (b) sin agitación.

Los resultados presentados en la Figura 7.2(a) con agitación en el medio de reacción, reflejan que:

- Para un volumen de 10 ml de HCl concentrado, el porcentaje de Rendimiento fue disminuyendo con el tiempo de reacción observándose que el tiempo óptimo de reacción alcanzado en los resultados fue a los 15 minutos, con un porcentaje de Rendimiento del 72%.
- Para un volumen de 20 ml y 30 ml del reactivo, se observa que el porcentaje de Rendimiento incrementa con el tiempo de reacción siendo el tiempo óptimo de reacción

de 45 minutos para el volumen de 30 ml (con un 58%), y de 60 minutos para el volumen de 20 ml (con un 66%).

- Independientemente del tiempo de reacción (excepto a los 60 minutos), el mayor porcentaje de Rendimiento fue obtenido cuando se usa 10 ml de HCl concentrado.
- Bajo estas condiciones de trabajo (Temperatura de reacción del 100°C y con agitación del medio de reacción), el mayor porcentaje de Rendimiento de clorhidrato de glucosamina se produce a un volumen óptimo de 10 ml de HCl concentrado y un tiempo de reacción de 15 minutos (con un 72%).

Por su parte, los resultados presentados en la Figura 7.2 (b) sin agitación en el medio de reacción, muestran que:

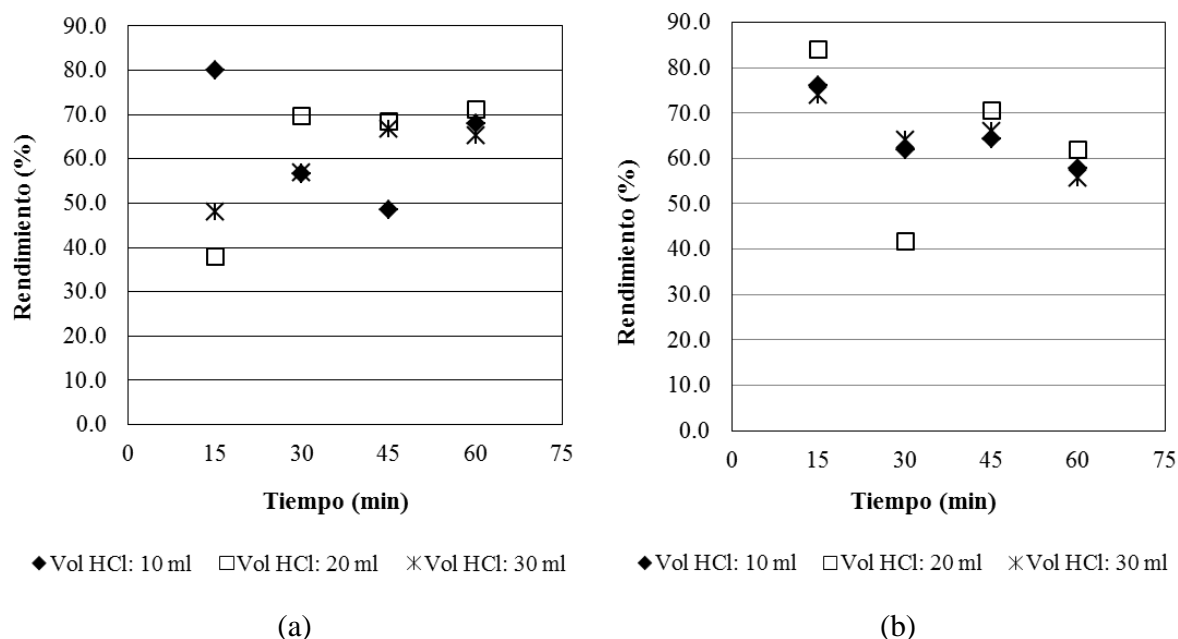
- Para un volumen de 10 ml de HCl concentrado, el porcentaje de Rendimiento disminuye con el tiempo de reacción siendo el tiempo de reacción óptimo a los 15 minutos, con un porcentaje de Rendimiento del 76%.
- Para un volumen de 20 ml y 30 ml del reactivo, se observa que el porcentaje de Rendimiento es mayor a un tiempo de reacción de 15 minutos (de 88% y 63% para 20 ml y 30 ml, respectivamente). Además, se observa que la tendencia en los resultados indican que el porcentaje de Rendimiento disminuye con el tiempo de reacción.
- Independientemente del tiempo de reacción (excepto a los 30 minutos), el mayor porcentaje de Rendimiento fue alcanzado cuando se utilizan 20 ml de HCl concentrado.
- Bajo estas condiciones de trabajo (Temperatura de reacción del 100°C, sin agitación del medio de reacción), el mayor porcentaje de Rendimiento de clorhidrato de glucosamina se produce a un volumen óptimo de 20 ml de HCl concentrado y un tiempo de reacción de 15 minutos (con un 88%).

En síntesis, la curva del porcentaje de Rendimiento sin agitación es apreciablemente superior a la curva con Agitación, Además, podemos decir que el comportamiento del porcentaje de Rendimiento del Clorhidrato de Glucosamina es inversamente proporcional al tiempo de reacción (excepto a 20 y 30 ml, con agitación). Es decir, que a medida que se aumenta el tiempo de reacción, el porcentaje de Clorhidrato de Glucosamina (producto final) decrece.

En cuanto a la optimización de volumen reactante, resulta más favorable trabajar, en condiciones de agitación, con un volumen de HCl concentrado de 10 ml; mientras que, sin agitación, con un volumen de HCl concentrado de 20 ml. En este último caso, se obtiene el mayor porcentaje de rendimiento para la producción de clorhidrato de glucosamina (88%).

## 7.2 Influencia del Etanol al 95% en la Cristalización del Clorhidrato de Glucosamina

En este análisis del comportamiento del porcentaje de Rendimiento en función del tiempo, se contemplan, además de las variables agitación y relación líquido-sólido, el uso del etanol para valorar su influencia en el porcentaje de Rendimiento del clorhidrato de glucosamina. En la Tabla A.4.1 se presentan los resultados del porcentaje de rendimiento de la obtención del clorhidrato de glucosamina a partir de quitina. En la Figura 7.3 se muestra de manera gráfica el promedio de los resultados obtenidos durante el proceso de obtención del clorhidrato de glucosamina.



**Figura 7.3** Porcentaje de Rendimiento del clorhidrato de glucosamina en función del tiempo, a diferentes volúmenes de ácido clorhídrico concentrado por gramo de quitina: (a) con agitación y (b) sin agitación; con uso de etanol en el proceso de cristalización.

Los resultados presentados en la Figura 7.3(a) con agitación en el medio de reacción, muestran que:

- Para un volumen de 10 ml de HCl concentrado, el porcentaje de Rendimiento disminuye con el tiempo de reacción de un 80% a 46%, observándose un ligero incremento hasta un 62% al tiempo de reacción de 60 minutos. El tiempo óptimo de reacción fue a los 15 minutos, con un porcentaje de Rendimiento del 80%.
- Para un volumen de 20 ml y 30 ml del reactivo, se observa que el porcentaje de Rendimiento incrementa con el tiempo de reacción siendo el tiempo óptimo de reacción de 60 minutos para el volumen de 20 ml (con un 71%), y de 30 ml (con un 65%).
- Independientemente del tiempo de reacción (excepto a los 15 minutos), el mayor porcentaje de Rendimiento fue obtenido cuando se usa 20 ml de HCl concentrado.
- Bajo estas condiciones de trabajo (Temperatura de reacción del 100°C y con agitación del medio de reacción y uso de etanol para la cristalización del producto), el mayor porcentaje de Rendimiento de clorhidrato de glucosamina se produce a un volumen óptimo de 10 ml de HCl concentrado y un tiempo de reacción de 15 minutos (con un 80%).

Por su parte, los resultados presentados en la Figura 7.3 (b) sin agitación en el medio de reacción, muestran que:

- Hay un comportamiento similar para los tres volúmenes de HCl concentrado. Primero se observa una disminución del porcentaje de Rendimiento seguido de un aumento y una posterior disminución de este parámetro con el tiempo de reacción. Los resultados también muestran que el tiempo óptimo de reacción es 15 minutos para los tres

volúmenes, con un porcentaje de Rendimiento del 76% (10 ml), 84% (20 ml) y 73.8% (30 ml).

- Independientemente del tiempo de reacción (excepto a los 30 minutos), el mayor porcentaje de Rendimiento fue alcanzado cuando se utilizan 20 ml de HCl concentrado.
- Bajo estas condiciones de trabajo (Temperatura de reacción del 100°C, sin agitación del medio de reacción y usando etanol para la cristalización del producto), el mayor porcentaje de Rendimiento de clorhidrato de glucosamina se produce a un volumen óptimo de 20 ml de HCl concentrado y un tiempo de reacción de 15 minutos (84%).

En síntesis, para ambos casos (con agitación y sin agitación) el tiempo óptimo de reacción para la producción de clorhidrato de glucosamina es 15 minutos. Con respecto a la optimización de volumen reactante, resulta más favorable trabajar, en condiciones de agitación, con un volumen de HCl concentrado de 10 ml; y sin agitación, con un volumen de HCl concentrado de 20 ml. En este último caso, se obtiene el mayor porcentaje de rendimiento para la producción de clorhidrato de glucosamina (84%).

Al hacer una comparación entre los resultados del porcentaje de Rendimiento sin etanol y con etanol, se muestra lo siguiente:

- **Con agitación**, el comportamiento del porcentaje de rendimiento con respecto al tiempo es similar; es decir, cuando se utiliza 10 ml de HCl concentrado se observa una disminución del porcentaje de rendimiento, obteniéndose el mayor valor a 15 minutos y con el uso de etanol en la etapa de cristalización (80%). En cambio cuando se utiliza 20 ml y 30 ml, el del porcentaje de rendimiento aumenta con el tiempo obteniéndose los valores más altos con utilización del etanol (71% a los 60 minutos y 66.8% a los 45 minutos, respectivamente).
- **Sin agitación**, el comportamiento del porcentaje de rendimiento con respecto al tiempo también es similar; es decir, primero se observa una disminución del porcentaje de Rendimiento seguido de un aumento y una posterior disminución de este parámetro con el tiempo de reacción. En este caso, los mayores porcentajes de Rendimiento se obtiene cuando no se utiliza etanol, siendo el mayor rendimiento (88%) bajo las condiciones experimentales de 15 minutos de tiempo de reacción y 1:20 relación sólido-líquido.

### 7.3 Caracterización Química del Clorhidrato de Glucosamina (a nivel de laboratorio)

La caracterización del producto obtenido incluye: el análisis de plomo por Espectrometría de absorción atómica; el Análisis de sulfato por colorimetría por el Método SulfaVer 4 y Espectros de absorción en la región de infrarrojo (Equipo FT-IR).

#### 7.3.1 Comparación de las Propiedades Químicas del Clorhidrato de Glucosamina

De un total de 48 muestras obtenidas en el experimento de obtención de clorhidrato de glucosamina a partir de la hidrólisis de quitina, se seleccionaron cinco considerando los mayores porcentajes de rendimiento para el análisis de plomo y sulfato (ver Figura 7.4).





(a) Muestra 1B



(b) Muestra 3A



(c) Muestra 6B



(d) Muestra 7A



(e) Muestra 7B

**Figura 7.4** Fotos de las muestras de clorhidrato de glucosamina obtenidas a nivel de laboratorio y utilizadas para el análisis de plomo, sulfato y Espectrofotometría IR.

Los resultados (ver Tabla 7.1) muestran que los valores están por debajo del límite de detección del equipo, lo que nos confirma que las concentraciones de iones plomo e iones sulfato son muy bajas en los cristales. Al comparar estos resultados con aquellos presentados en la Tabla A.3.1 del Anexo A.3, se confirma que el clorhidrato de glucosamina obtenido a nivel de laboratorio cumple con los parámetros de calidad de la muestra de referencia.

**Tabla 7.1** Análisis Fisicoquímico de muestras de clorhidrato de glucosamina obtenida a nivel de laboratorio

| Análisis<br>Muestras      | Rendimiento<br>(%) | Determinación de<br>Espectros de Absorción<br>en la región de<br>infrarrojo (FT-IR), % | Determinación<br>de Plomo<br>ppm | Determinación<br>de Sulfatos<br>ppm (SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup> |
|---------------------------|--------------------|--|----------------------------------|--|
| Glucosamina<br>Referencia | NA                 | NA   | < 10                             | ≤ 0.24 %   |
| 1 B                       | 76.0               | 98.83  | < 0.1                            | 0  |
| 3 A                       | 88.0               | 97.97  | < 0.1                            | 0  |
| 6 B                       | 91.6               | 98.91  | < 0.1                            | 0  |
| 7 A                       | 76.0               | 99.31  | < 0.1                            | 0  |
| 7 B                       | 80.0               | -  | < 0.1                            | 0  |

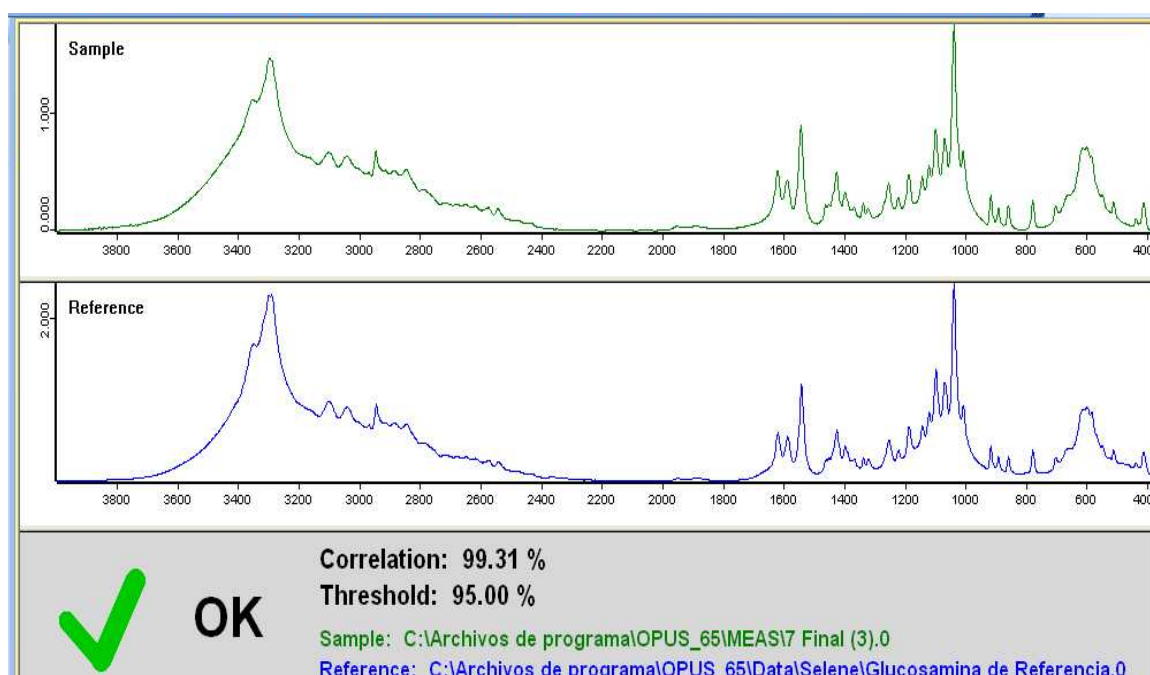
A: Muestra final sin etanol

B: Muestra final con etanol

### 7.3.2 Espectros IR del Clorhidrato de Glucosamina producido en el Experimento, con respecto a muestra comercial

Treinta y seis muestras, seleccionadas aleatoriamente, fueron analizadas en un Espectrofotómetro de Transformada de Fourier en la región infrarroja (FT-IR) y se compararon con una muestra de Referencia de Clorhidrato de Glucosamina (Referencia comercial), obteniéndose resultados de Correlación superiores al 95%.

Uno de los espectros de Clorhidrato de Glucosamina (sample 7A), bajo las condiciones experimentales de trabajo (Temperatura de reacción: 100°C, tiempo de reacción: 15 minutos, relación sólido-líquido: 1:10, con agitación y sin etanol en la cristalización) y el Clorhidrato de Glucosamina de referencia comercial (Reference), obtenidos en el Equipo FT-IR, se muestran en la Figura 7.5. Los espectros IR de las 35 muestras restantes se encuentran en el Anexo.



**Figura 7.5** Espectros IR de muestra de clorhidrato de glucosamina (sample 7A) y una muestra de clorhidrato de glucosamina comercial (Reference).

La Figura muestra que los espectros FT-IR de ambos materiales son esencialmente idénticas con respecto a las posiciones de las bandas de los principales grupos de la estructura química del Clorhidrato de Glucosamina. Este hecho se confirma mediante el coeficiente de correlación de 99,31%, lo que indica un grado muy alto de similitud entre el espectro de la muestra (sample 7A) y el espectro de referencia (Reference).

El espectro del FT-IR de Clorhidrato de Glucosamina del Experimento muestra una banda intensa de estiramiento a 3370 a 3300  $\text{cm}^{-1}$  asociado con el O-H y N-H, una banda de absorción (de tijera) a 1615  $\text{cm}^{-1}$  debido al grupo  $\text{NH}_2$  y una banda a 1094  $\text{cm}^{-1}$  debido al alcohol -OH secundario.

## VIII. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

El tiempo de reacción influye considerablemente en el porcentaje de rendimiento. Los resultados muestran que los porcentajes de rendimiento fueron más altos a los 15 minutos de reacción, con agitación y sin agitación.

La variable relación sólido-líquido indica que cuando se utiliza agitación, el mayor porcentaje de rendimiento se produce a una relación 1:10 (72% y 80%, sin etanol y con etanol, respectivamente); mientras que cuando no se agita el sistema de reacción, el mayor porcentaje de rendimiento se produce a una relación 1:20 (88% y 84%, sin etanol y con etanol, respectivamente).

Los resultados de los experimentos muestran que la agitación en el período de síntesis de clorhidrato de glucosamina no influye significativamente en el porcentaje de rendimiento, independientemente de la adición de Etanol en la Etapa de Cristalización.

El uso de etanol es de poca influencia en el porcentaje de rendimiento dado que el comportamiento de las curvas del porcentaje de rendimiento vs. el tiempo de reacción no se ve drásticamente afectado, lo cual representa una ventaja económica ya que no se incrementarían los costos de producción.

Los mayores porcentajes de Rendimiento se obtienen cuando no se utiliza etanol en la etapa de cristalización, siendo el mayor porcentaje de rendimiento (88%) bajo las condiciones experimentales de 15 minutos de tiempo de reacción, 1:20 relación sólido-líquido y sin agitación.

Los resultados del análisis químico muestra que las concentraciones de iones plomo e iones sulfato están por debajo del límite de detección del equipo, lo que nos confirma que son muy bajas en los cristales y que el clorhidrato de glucosamina obtenido a nivel de laboratorio cumple con los parámetros de calidad de la muestra de referencia.

Los espectros FT-IR de las muestras analizadas y de la muestra de referencia son esencialmente idénticos con respecto a las posiciones de las bandas de los principales grupos de la estructura química del Clorhidrato de Glucosamina. Este resultado se confirma mediante el coeficiente de correlación superior al 95% en todas las muestras, lo que indica un grado muy alto de similitud entre el espectro de las muestras y el espectro de referencia.

## **IX. Recomendaciones**

Para continuar futuros estudios relacionados con la obtención de Clorhidrato de Glucosamina, a partir de quitina, se recomienda lo siguiente:

- Hacer un análisis fisicoquímico completo (de acuerdo al certificado de calidad, Anexo A3.1) a la muestra de clorhidrato de glucosamina obtenida a nivel de laboratorio bajo las condiciones experimentales en las cuales se obtuvo el mayor porcentaje de rendimiento.
- Optimizar el uso del etanol al 95% en el lavado de los cristales, para disminuir los costos de producción.
- Implementar un sistema de tratamiento para la recuperación del etanol utilizado para el lavado de los cristales.
- Implementar un sistema de tratamiento para la solución de desecho (ácido clorhídrico más impurezas) resultante de la etapa de cristalización.

## X. Referencias Bibliográficas

**Pastor, A. (2004).** “Quitina y Quitosano: Obtención, Caracterización y Aplicaciones”, Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial 2004, pp. 244–245.

**Andradel, V., B. Barros, K. Fukushima, y G.M. Takaki (2003).** “Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) - A factorial study”. Departamento de Patología, Universidad Federal de Alagoas, Rev Iberoam Micol, Vol. 20, pp. 149–153.

**Beaney, P., J. Lizardi-Mendoza, y M. Healy (2005).** “Comparison of Chitins Produced by Chemical and Bioprocessing Methods”. J. Chem. Technol. and Biotechnol, Vol. 80(2), pp. 145–150.

**Benavente, M. (2008).** “Adsorption of Metallic Ions onto Chitosan: Equilibrium and Kinetic Studies”. Licentiate Thesis in Chemical Engineering, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.

**Berg, J.M., L. Stryer y J.L. Tymoczki (2008).** “Bioquímica”. Versión española por: Prof. José M. Macarulla, Editorial Reverté, Barcelona, España, pp. 313.

**Braconnot, H. (1811).** “Recherches Analytiques Sur la Nature des Champignons”, Annales de Chimie, Vol. 79, pp. 265-304.

**Edward J. T. (1955).** “Stability of glycosides to acid hydrolysis - A conformational analysis”. Chem. Ind., 36, 1102-4.

**Freixedas, F.G., A. Costa y O. Söhnle (2000).** “Cristalización en disolución: Conceptos Básicos”, Editorial Reverté, S.A., Impreso en España, pp. 1–13.

**Gandhi, N. y J.K. Laidler (2002).** “Preparación del clorhidrato de glucosamina”, Patentes de los Estados Unidos 6486307.

**Gerente, C., V.K.C. Lee, P. Le Cloirec, y G. McKay (2007).** “Application of chitosan for the removal of metals from wastewaters by adsorption – mechanisms and models review”. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. Vol. 37, pp. 41–127.

**Hackman R. H. (1962).** “Studies on chitin V: Action of mineral acids on chitin”. Aust. J. Biol. Sci., 15, 526-32.

**Harish, P.K.V. y R.N. Tharanathan (2007).** “Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited applications potential – An overview”, Trends in Food Science and Technology, Vol. 18, pp. 117–131.

**Hernández, D. y D. Escorcía (2009).** “Propuesta técnica para la obtención de quitina a partir de caparazones de crustáceos a nivel de planta piloto”, Tesis para optar al título de Ingeniero Químico, UNI, Managua, Nicaragua.

**Haupt, J.B., R. McMillan, C. Wein y S.D. Paget-Dellio (1999).** “Effect of glucosamine hydrochloride in the treatment of pain of osteoarthritis of the knee”, *Journal of Rheumatol* , Vol. 26(11), pp. 2423–2430.

**Lárez, C. (2006).** “Quitina y quitosano : materiales del pasado para el presente y el futuro”, *Avances en Química*, Vol. 1(2), pp. 15–21.

**Lee, M.Y., F. Var, Y. Shin-ya, T. Kajiuchi y J.W. Yang (1999).** “Optimum conditions for the precipitation of chitosan oligomers with DP 5-7 in concentrated hydrochloric acid at low temperature”, *Process Biochemistry*, Vol. 34, pp. 493–500.

**Leite, A.C.C., I.A. Silveira, V.C. Matos, J.E.X. Matos, A.C. Monteiro-Moreira y J. Mafezoli (2002).** “Otimização Da Síntese, Análises Físico-Químicas e Utilização Em Um Modelo Experimental Do Cloridrato De Glucosamina“. In: VI REUNIÃO REGIONAL NORDESTE SBBq, 2002, Fortaleza. Anais da VI Reunião Regional Nordeste da SBBq.

**Mojarrad, J.S., M. Nemati, H. Valizadeh, M. Ansarin y S. Bourbour (2007).** “Preparation of Glucosamine from Exoskeleton of Shrimp and Predicting Production Yield by Response Surface Methodology“, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 55, pp. 2246–2250.

**Muzzarelli R.A.A. (2001),** “Evaluación clínica y bioquímica de la N-Acetil-Glucosamina en la hipercolesterolemia y el control del sobrepeso.” *Seguimientos Clínicos Navalpharma S.A.*, Centro de Biomateriales Innovadores, Universidad d’Ancona, Via Ranieri 67, 60100 Ancona, Italia.

**Myerson, A.S. (2001).** “Handbook of Industrial Crystallization“, Elsevier Science and Technology, 2<sup>nd</sup> Edition, ISBN 0750570126, pp : 53–54, 93–94.

**Odier, A. (1823).** “Mémoire sur la Composition Chimique des Parties Cornées des Insectes“. *Mém. Soc. Histoire Nat.*, Vol. 1, pp. 29-42.

**Pettersen H., Sannes A., Holme H. K., Kristensen Å. H., Dornish M. and Smidsrød O. (2000).** “Thermal depolymerization of chitosan salts”. In: *Advances in Chitin Science 4* (Peter M.G., Domard A. & Muzzarelli R.A.A. eds.) University of Potsdam.

**Santhosh, S. y P.T. Mathew (2007),** “Preparation and properties of glucosamine and carboxymethylchitin from shrimp shell”, Wiley InterScience, DOI 10.1002/app.27083.

**Stryer L. (1995).** “Biochemistry”, 4th ed. W.H. Freeman and Company, New York.

**Xu, Y., C. Gallert y J. Winter (2008),** “Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification”, *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 79, pp. 687–697.

**Páginas WEB consultadas:**

**CebaNatural:** “Cartifit Glucosamina-Condrotina”, [Consulta: Enero 2010]  
<<http://www.cebanatural.com/cartifit-glucosaminacondroitina-p-478-10.html>>

**Centro de Trámites de las Exportaciones (CETREX):** “Todos los Productos de Exportación Enero-Diciembre 2009”, República de Nicaragua, [Consulta: Mayo 2010]  
<<http://www.cetrex.gob.ni/website/servicios/estadisticas.jsp>>

**Centro Médico Docente Adaptógeno (CMA):** “Sulfato de glucosamina y sulfato de condroitin”, [Consulta: Mayo 2010]  
<[http://www.adaptogeno.com/productos/sulfato\\_gluco\\_condro.asp](http://www.adaptogeno.com/productos/sulfato_gluco_condro.asp)>

**Consumer Eroski:** Los Suplementos de Glucosamina, [Consulta: Enero 2010].  
<<http://www.consumaseguridad.com/sociedad-y-consumo/2004/05/15/12350.php>>.

**Fuertes A.:** “La glucosamina y su relación con la artrosis”, [Consulta: Mayo 2010]  
<[http://www.mifarmacia.es/producto.asp?Producto=../contenido/articulos/articulos\\_glucosamina\\_y\\_artrosis](http://www.mifarmacia.es/producto.asp?Producto=../contenido/articulos/articulos_glucosamina_y_artrosis)>.

**Life Force Internacional (LFI):** “Glucosamine hydrochloride vs. Glucosamine sulfate”, [Consulta: Mayo 2010]  
<<http://www.pillfreevitamins.com/study.htm#mid>>

**Linoflax.com (2010):** “Para que sirve la glucosamina”, [Consulta: Mayo 2010]  
<<http://www.linoflax.com/glucosamina/para-que-sirve-la-glucosamina.htm>>

**Pronat:** “Glucosamina Sulfato” [Consulta: Mayo 2010]  
<[http://www.pronat.com.mx/articulos/art67\\_glucosamina\\_sulfato.html](http://www.pronat.com.mx/articulos/art67_glucosamina_sulfato.html)>

**Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC):** “Sulfato de Glucosamina”, [Consulta: Mayo 2010] <<http://www.bago.com/bago/bagoarg/biblio/art6web.htm>>

**Webmd:** “Glucosamina clorhidrato” [Consulta: Mayo 2010]  
<<http://www.webmd.com/vitamins-supplements/ingredientmono-747-GLUCOSAMINE+HYDROCHLORIDE.aspx?activeIngredientId=747&activeIngredientName=GLUCOSAMINE+HYDROCHLORID>>

**Wikipedia (2010a):** “Quitina”, [Consulta: Mayo 2010] <<http://es.wikipedia.org/wiki/Quitina>>

**Wikipedia (2010b):** “Chitosan”, [Consulta: Mayo 2010]  
<<http://es.wikipedia.org/wiki/Chitosan>>

**Wikipedia (2010c):** “Glucosamina”, [Consulta: Enero 2010]  
<<http://es.wikipedia.org/wiki/Glucosamina>>



**Wikipedia (2010d):** “N-Acetilglucosamina”, [Consulta: Mayo 2010]

<<http://es.wikipedia.org/wiki/N-Acetilglucosamina>>

**Wikipedia (2011e):** “Glucosamina”, [Consulta: Julio 2011]

<[http://es.wikipedia.org/wiki/Agua\\_destilada](http://es.wikipedia.org/wiki/Agua_destilada)>

**Vademécum:** “Glucosamina” [Consulta: Mayo 2010]

<<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/g013.htm>>



## ANEXOS

**Anexo A.1:** Tabla de materiales y Equipos de laboratorio

**Anexo A.2:** Diagramas de Flujo de la obtención de quitina y clorhidrato de glucosamina

**Anexo A.3:** Tabla de las características fisicoquímicas del clorhidrato de glucosamina comercial.

**Anexo A.4:** Resultados del Porcentaje de Rendimiento a diferentes tiempos de reacción, con y sin agitación, y volumen de ácido clorhídrico concentrado.

**Anexo A.5:** Determinaciones Analíticas del clorhidrato de glucosamina.

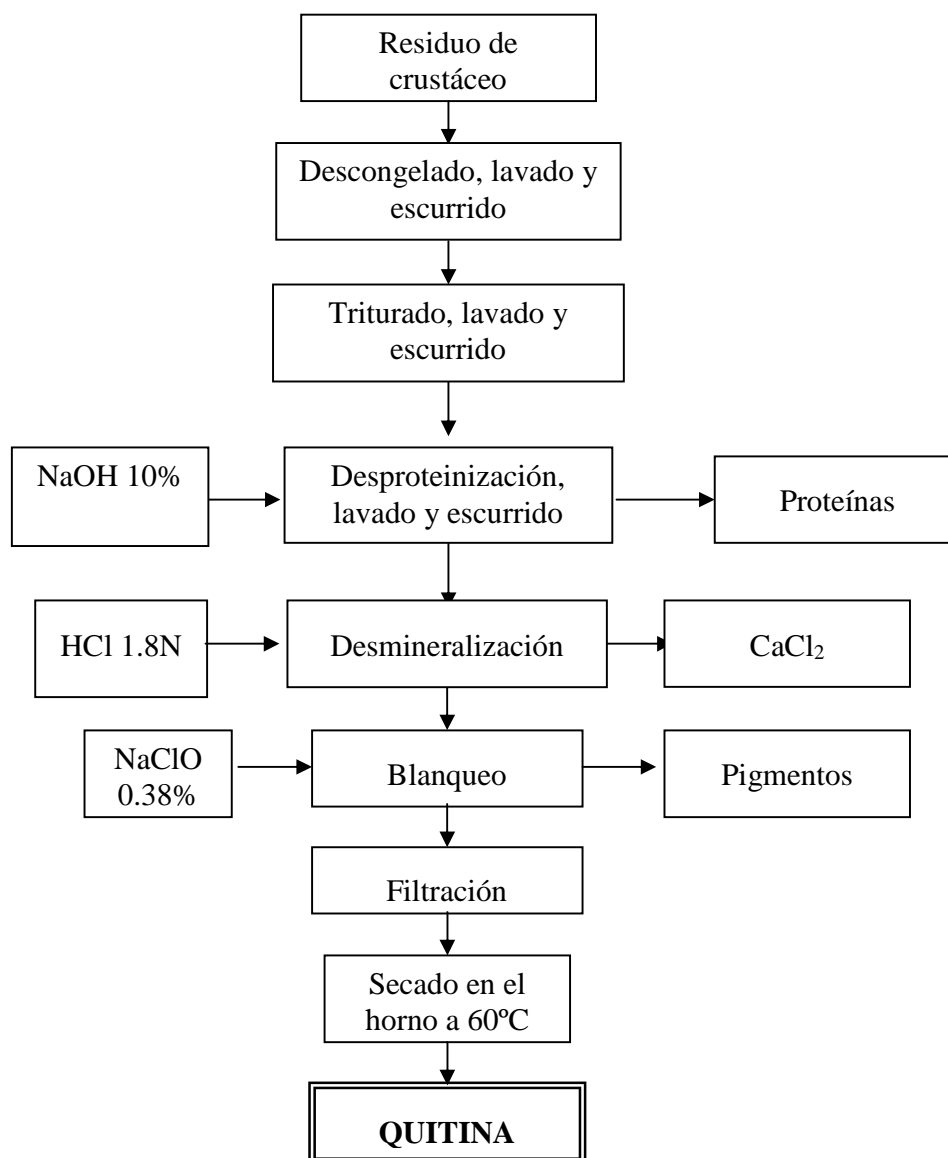
**Anexo A.6:** Espectros de absorción en la región de Infrarrojo (Equipo FT-IR) de muestras de clorhidrato de glucosamina obtenidas a nivel de laboratorio y correlacionadas con la muestra de Referencia comercial.

**Anexo A.1:** Tabla de materiales y Equipos de laboratorio**Tabla A.1.1 Equipos utilizados para la parte experimental**

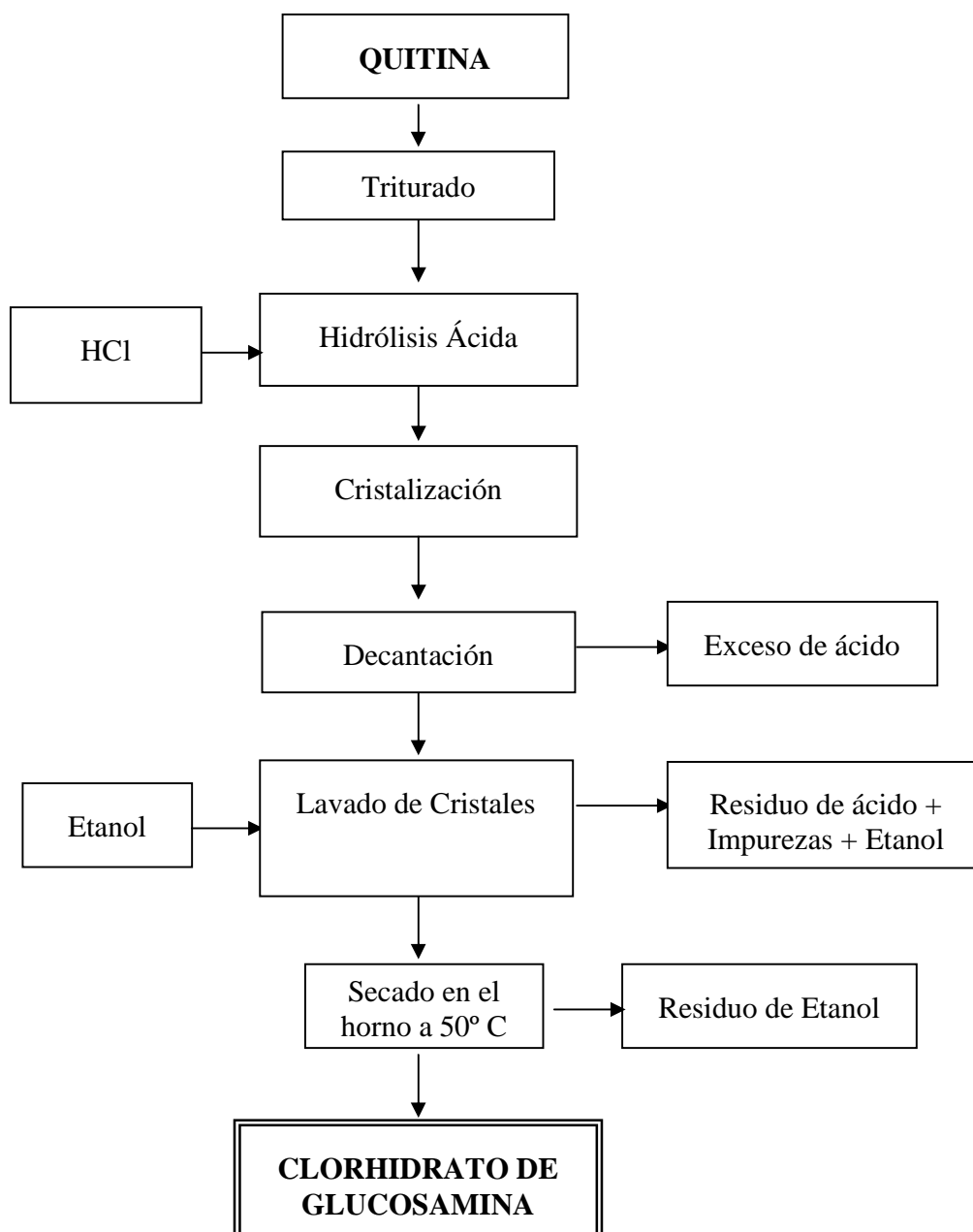
|  |   |  |
|--|---|--|
|   |    |                       |
| Pancha de calentamiento y agitación.<br><b>CIMAREC Barnstead Industrial</b><br>Modelo No. SP131635, No. de Serie:<br>1769071202949 | Balanza analítica de alta<br>precisión (0.0001 g).<br><b>OAHUS Adventer TM,</b><br>OAHUS Corp USA, No. de<br>Serie: G0851202020056. | Balanza electrónica o digital de<br>0.1 g. <b>Sartorius TE 6101 ISO</b><br>9001, No. de Serie: 17404586. |
|    |   |                      |
| Espectrofotómetro FT-IR<br>FT-IR ALPHA T Bruker.   | Manta Calefactora.  | Campana Extractora de Gases.   |
|   |    |                     |
| Horno <b>THERMO SCIENTIFIC</b><br><b>THERMOLYNE</b> , Modelo: F6010  | Refrigeradora, <b>Phillips</b><br><b>Tropical</b>   | Procesador de alimentos<br><b>Modelo: Oster</b>  |
|   |    |                     |
| <b>pH-metro 330i “WTW”</b>   | <b>Colorímetro HACH DR 500</b>  | Espectrometro de Absorción<br>Atómica <b>GBC AAS 932 plus</b>  |

Tabla A.1.2 Materiales a utilizados en la parte experimental

|  |   |   |
|--|---|---|
|               |            |                |
| Sistema de Reflujo o Condensador. (Hidrólisis ácida de la quitina) <b>Thermal Pyrex</b> .      | Balón de fondo plano. <b>Rasotherm</b> , Volumen: 1 L.                                      | Balón de fondo redondo, <b>Pyrex</b> Volumen: 500 ml.   |
|               |            |                |
| Botellas de autoclave (Fascos para almacenar muestras) <b>SCHOTT DURAN</b> Volumen: 10 y 50 ml | Papel filtro <b>Whatman Qualitative Circles</b> Diámetro: 125 mm. No. de Catalogo: 1001 125 | Termómetro <b>ASTM 1C-99/BS 593 F150 C/76</b> MM/MM Partial Immersion - 20+50°C, # de Serie: 6822 |
|             |          |              |
| Espátulas <b>Metálicas</b> (Para Manipular muestras, material)                                 | Agitador magnético  | Parafilm <b>Laboratory Film</b> Pechiney Plastic Packaging  |
|             |          |              |
| Soporte Universal <b>Metálico</b>  | Tamiz <b>Malla 20</b> Diámetro de partícula (Dp) < 1 mm                                     | Embudo Hirsch <b>Pyrex USA</b> ASTM 40-90 C   |

**Anexo A.2: Diagramas de Flujo de la obtención de quitina y clorhidrato de glucosamina**

**Figura A.2.1** Diagrama de Bloque del Proceso de Extracción de Quitina a partir de desechos de crustáceos (Hernández y Escorcia, 2009).



**Figura A.2.2** Diagrama de Bloque del Proceso de Extracción de Clorhidrato de glucosamina a partir de Quitina.

**Anexo A.3: Características Físico-químicas del Clorhidrato de Glucosamina comercial.****Tabla A.3.1** Certificado de Calidad de Glucosamina Comercial

|  |                                       |                 |                          |
|--|---------------------------------------|-----------------|--------------------------|
| <b>Jining Green Group Co., Ltd</b><br>No. 96 Lingyun Road, High Zew Zone, Jining, Shandong, China<br>www.cn-chondroitin.com<br>Tel: 0086 537 2918819 Fax: 0086 537 2916599<br><b>CERTIFICATE OF ANALYSIS</b> |                                       |                 |                          |
| <b>Product</b>   | D- Glucosamine Hcl (USP 30)           |                 |                          |
| <b>Batch No.</b>   | <b>Report Date</b>                    | <b>Quantity</b> | <b>S/C No. or PO No.</b> |
| GR20081020   | 20 OCT., 2008                         | 1000KG          |                          |
| <b>Items</b>   | <b>Specifications</b>                 |                 | <b>Results</b>           |
| Appearance   | White Crystalline Free Flowing Powder |                 | PASS                     |
| Assay  | 98.0%---102.0%                        |                 | 99.86%                   |
| Specific Rotation(5%,25°C)   | +70.0°--- +73.0°                      |                 | +71.90°                  |
| Loss on Drying   | ≤1.0%                                 |                 | 0.06%                    |
| Residue on Ignition  | ≤0.1%                                 |                 | 0.03%                    |
| Chloride   | Meets the Requirements                |                 | Meets the Requirements   |
| Sulfate  | ≤0.24%                                |                 | PASS                     |
| Heavy Metals( as Pb)   | ≤10PPM                                |                 | PASS                     |
| Organic volatile impurities  | Meets the Requirements                |                 | Meets the Requirements   |
| PH   | 3.0--5.0                              |                 | 4.1                      |
| Arsenic  | ≤3PPM                                 |                 | PASS                     |
| Particle Size  | 100% through 40 Mesh                  |                 | PASS                     |
| Total Plate Count  | 1000cfu/gm Max                        |                 | PASS                     |
| Yeast & Mold   | 100cfu/gm Max                         |                 | PASS                     |
| Salmonella   | Negative                              |                 | NEGATIVE                 |
| E. Coli  | Negative                              |                 | NEGATIVE                 |
| Manufacturing Date/ Expiry Date  | 20 OCT.,2008/ 20 OCT, 2010            |                 |                          |
| <b>Conclusion: Conform to the USP30 requirements.</b><br>Inspector: Liu Benlu QC Manager: Wang Min   |                                       |                 |                          |

**Anexo A.4: Resultados del Rendimiento de obtención de clorhidrato de glucosamina.****Tabla A.4.1** Resultados del Porcentaje de Rendimiento a diferentes tiempos de reacción, con y sin agitación, volumen de HCl concentrado, y uso de etanol (muestras B).

| Tiempo | Agitación | Relacion S:L | No. Exp | Rendimiento TOTAL (%) | Tipo A / B | Rendimiento (%) |
|--------|-----------|--------------|---------|-----------------------|------------|-----------------|
| 15     | NO        | 1:10         | 1A      | 76                    | A          | 76.00           |
| 15     | NO        | 1:10         | 1B      |                       | B          | 76.00           |
| 15     | NO        | 1:20         | 3A      | 86                    | A          | 88.00           |
| 15     | NO        | 1:20         | 3B      |                       | B          | 84.00           |
| 15     | NO        | 1:30         | 5A      | 58                    | A          | 60.00           |
| 15     | NO        | 1:30         | 5B      |                       | B          | 56.00           |
| 15     | NO        | 1:30         | 6A      | 79                    | A          | 66.00           |
| 15     | NO        | 1:30         | 6B      |                       | B          | 91.60           |
| 15     | SI        | 1:10         | 7A      | 78                    | A          | 76.00           |
| 15     | SI        | 1:10         | 7B      |                       | B          | 80.00           |
| 15     | SI        | 1:10         | 8A      | 74                    | A          | 68.00           |
| 15     | SI        | 1:10         | 8B      |                       | B          | 80.00           |
| 15     | SI        | 1:20         | 9A      | 36                    | A          | 44.00           |
| 15     | SI        | 1:20         | 9B      |                       | B          | 28.00           |
| 15     | SI        | 1:20         | 10A     | 46                    | A          | 44.00           |
| 15     | SI        | 1:20         | 10B     |                       | B          | 48.00           |
| 15     | SI        | 1:30         | 11A     | 44                    | A          | 40.00           |
| 15     | SI        | 1:30         | 11B     |                       | B          | 48.00           |
| 30     | NO        | 1:10         | 13A     | 59                    | A          | 70.80           |
| 30     | NO        | 1:10         | 13B     |                       | B          | 47.60           |
| 30     | NO        | 1:10         | 14A     | 72                    | A          | 68.00           |
| 30     | NO        | 1:10         | 14B     |                       | B          | 76.00           |
| 30     | NO        | 1:20         | 15A     | 44                    | A          | 46.80           |
| 30     | NO        | 1:20         | 15B     |                       | B          | 41.60           |
| 30     | NO        | 1:30         | 17A     | 54                    | A          | 48.00           |
| 30     | NO        | 1:30         | 17B     |                       | B          | 60.00           |
| 30     | NO        | 1:30         | 18A     | 62                    | A          | 56.00           |
| 30     | NO        | 1:30         | 18B     |                       | B          | 68.00           |
| 30     | SI        | 1:10         | 19A     | 46                    | A          | 51.60           |
| 30     | SI        | 1:10         | 19B     |                       | B          | 41.20           |
| 30     | SI        | 1:10         | 20A     | 72                    | A          | 72.00           |
| 30     | SI        | 1:10         | 20B     |                       | B          | 72.00           |
| 30     | SI        | 1:20         | 21A     | 55                    | A          | 51.20           |
| 30     | SI        | 1:20         | 21B     |                       | B          | 59.20           |
| 30     | SI        | 1:20         | 22A     | 72                    | A          | 64.00           |
| 30     | SI        | 1:20         | 22B     |                       | B          | 80.00           |
| 30     | SI        | 1:30         | 23A     | 50                    | A          | 46.80           |
| 30     | SI        | 1:30         | 23B     |                       | B          | 53.60           |
| 30     | SI        | 1:30         | 24A     | 58                    | A          | 56.00           |
| 30     | SI        | 1:30         | 24B     |                       | B          | 60.00           |
| 45     | NO        | 1:10         | 25A     | 40                    | A          | 31.20           |

|    |    |      |             |    |          |       |
|----|----|------|-------------|----|----------|-------|
| 45 | NO | 1:10 | <b>25B</b>  |    | <b>B</b> | 48.80 |
| 45 | NO | 1:10 | <b>26A</b>  | 78 | <b>A</b> | 76.00 |
| 45 | NO | 1:10 | <b>26B</b>  |    | <b>B</b> | 80.00 |
| 45 | NO | 1:20 | <b>27A</b>  | 51 | <b>A</b> | 50.80 |
| 45 | NO | 1:20 | <b>27B</b>  |    | <b>B</b> | 52.00 |
| 45 | NO | 1:20 | <b>28A</b>  | 83 | <b>A</b> | 76.00 |
| 45 | NO | 1:20 | <b>28B</b>  |    | <b>B</b> | 89.20 |
| 45 | NO | 1:30 | <b>29A</b>  | 62 | <b>A</b> | 56.00 |
| 45 | NO | 1:30 | <b>29B</b>  |    | <b>B</b> | 68.00 |
| 45 | NO | 1:30 | <b>30A</b>  | 64 | <b>A</b> | 64.00 |
| 45 | NO | 1:30 | <b>30B</b>  |    | <b>B</b> | 64.00 |
| 45 | SI | 1:10 | <b>31A</b>  | 21 | <b>A</b> | 17.60 |
| 45 | SI | 1:10 | <b>31B</b>  |    | <b>B</b> | 24.80 |
| 45 | SI | 1:10 | <b>32A</b>  | 68 | <b>A</b> | 64.00 |
| 45 | SI | 1:10 | <b>32B</b>  |    | <b>B</b> | 72.00 |
| 45 | SI | 1:20 | <b>33A</b>  | 56 | <b>A</b> | 57.20 |
| 45 | SI | 1:20 | <b>33B</b>  |    | <b>B</b> | 54.80 |
| 45 | SI | 1:20 | <b>34A</b>  | 71 | <b>A</b> | 59.60 |
| 45 | SI | 1:20 | <b>34B</b>  |    | <b>B</b> | 82.00 |
| 45 | SI | 1:30 | <b>35A</b>  | 61 | <b>A</b> | 56.40 |
| 45 | SI | 1:30 | <b>35B</b>  |    | <b>B</b> | 65.60 |
| 45 | SI | 1:30 | <b>36A</b>  | 64 | <b>A</b> | 60.00 |
| 45 | SI | 1:30 | <b>36B</b>  |    | <b>B</b> | 68.00 |
| 60 | NO | 1:10 | <b>37A</b>  | 40 | <b>A</b> | 35.60 |
| 60 | NO | 1:10 | <b>37B</b>  |    | <b>B</b> | 43.60 |
| 60 | NO | 1:10 | <b>38A</b>  | 70 | <b>A</b> | 68.00 |
| 60 | NO | 1:10 | <b>38B</b>  |    | <b>B</b> | 72.00 |
| 60 | NO | 1:20 | <b>39A</b>  | 53 | <b>A</b> | 54.00 |
| 60 | NO | 1:20 | <b>39B</b>  |    | <b>B</b> | 52.00 |
| 60 | NO | 1:20 | <b>40A</b>  | 66 | <b>A</b> | 60.00 |
| 60 | NO | 1:20 | <b>40B</b>  |    | <b>B</b> | 72.00 |
| 60 | NO | 1:30 | <b>41A</b>  | 45 | <b>A</b> | 42.00 |
| 60 | NO | 1:30 | <b>41B.</b> |    | <b>B</b> | 47.20 |
| 60 | NO | 1:30 | <b>42A</b>  | 60 | <b>A</b> | 56.00 |
| 60 | NO | 1:30 | <b>42B</b>  |    | <b>B</b> | 64.00 |
| 60 | SI | 1:10 | <b>43A</b>  | 56 | <b>A</b> | 52.00 |
| 60 | SI | 1:10 | <b>43B</b>  |    | <b>B</b> | 60.00 |
| 60 | SI | 1:10 | <b>44A</b>  | 74 | <b>A</b> | 72.00 |
| 60 | SI | 1:10 | <b>44B</b>  |    | <b>B</b> | 76.00 |
| 60 | SI | 1:20 | <b>45A</b>  | 64 | <b>A</b> | 60.00 |
| 60 | SI | 1:20 | <b>45B</b>  |    | <b>B</b> | 68.00 |
| 60 | SI | 1:20 | <b>46A</b>  | 73 | <b>A</b> | 71.60 |
| 60 | SI | 1:20 | <b>46B</b>  |    | <b>B</b> | 74.40 |
| 60 | SI | 1:30 | <b>47A</b>  | 47 | <b>A</b> | 50.00 |
| 60 | SI | 1:30 | <b>47B</b>  |    | <b>B</b> | 44.80 |
| 60 | SI | 1:30 | <b>48A</b>  | 73 | <b>A</b> | 61.20 |
| 60 | SI | 1:30 | <b>48B</b>  |    | <b>B</b> | 85.60 |



## Anexo A.5: Determinaciones Analíticas del clorhidrato de glucosamina

### A.5.1 Determinación de Pb por Espectrometría de Absorción Atómica

Todas las soluciones fueron preparadas cuidadosamente, utilizando los equipos y utensilios de laboratorio adecuado y bien lavados con ácidos minerales y agua des-ionizada, para evitar la contaminación de los materiales y la alteración de los resultados que se pretenden obtener.

#### 1. Discusión general.

**a) Principio:** Luz, a la longitud de onda de resonancia, es enfocada sobre la llama, que contiene átomo al estado fundamental. La intensidad inicial de la luz es disminuida en una cantidad determinada por la concentración de los átomos en la llama. Luego la luz es dirigida sobre el detector donde se mide la intensidad disminuida.

La absorbancia es el término más conveniente para caracterizar la absorción de luz, pues guarda relación lineal con la concentración. Cuando la absorbancia de soluciones patrón conteniendo concentraciones conocidas del analito se miden y se grafican los resultados de la absorbancia con respecto a la concentración, se establece una relación de calibración. Posteriormente se puede medir la absorbancia de soluciones de concentración desconocida y su concentración directamente de la curva de calibración.

**b) Interferencias:** las interferencias dependerán del tipo de metal que se esta analizando, estas pueden cambiar las respuesta del análisis produciendo un error o a veces es por causa de otro metal presente en la muestra.

#### 2. Aparatos y Materiales.

- a) Equipo de adsorción atómica marca GBC, modelo 932 Plus.
- b) Balones de 50mL, que contendrán las muestras a analizar y los estándares.

#### 3. Reactivos.

- a) Agua des-ionizada.
- b) 1000 mg/L  $Pb^{+}$ : Solución estándar de nitrato de plomo ( $Pb(NO_3)_2$ ).

#### 4. Procedimiento.

##### a) Preparación de los estándares de Plomo:

A partir del estándar primario se prepararon estándares en un rango de concentración de 100 a 1mg/L. Cada uno de los estándares se preparó midiendo el volumen requerido del estándar y aforando a la marca con la matriz. En la Tabla A.4.1 se muestran los volúmenes utilizados en la preparación de los estándares.

**Tabla A.5.1** Descripción de los Volúmenes utilizados para la preparación de Estándares

| Concentración del Estándar (mg/L) | Volumen de Estándar          | Volumen Total | Observaciones   |
|-----------------------------------|------------------------------|---------------|---|
| 100.0                             | 10mL de estándar de 1000mg/L | 100mL         | En todos los casos se debe aforar a la marca con agua des-ionizada. Se debe agregar 2 gotas de hidróxido de sodio al 3%, antes de aforar. |
| 50.0                              | 5mL de estándar de 1000mg/L  | 100mL         |   |
| 20.0                              | 2mL de estándar de 1000mg/L  | 100mL         |   |
| 10.0                              | 10mL de estándar de 100mg/L  | 100mL         |   |
| 5.0                               | 5mL de estándar de 100mg/L   | 100mL         |   |
| 1.0                               | 10mL de estándar de 10mg/L   | 100mL         |   |

**b) Determinación de Plomo:**

Para cada análisis se debe cumplir con las condiciones de operación dadas en la Tabla A.2.2. El análisis de Pb se realiza directamente en la muestra.

**Tabla A.5.2** Condiciones de operación

| Parámetro               | Plomo   |
|-------------------------|---|
| Longitud de onda        | 217.0 nm  |
| Bandpass                | 1.0 nm (HCl* estándar)                                    |
| Corriente de lámpara    | 5.0 mA (HCl* estándar)                                    |
| Condiciones de la llama | Llama magra del estándar                                  |
| Manual                  | Combustible 1.2 a 1.3 L/min<br>Aire ninguna alza agregada |

\* Holow Cathode lamp

## Apéndice A.5.2 Determinación de Sulfatos: Método SulfaVer 4<sup>1</sup>

### 1. Discusión General

a) **Principio:** Se adiciona un reactivo en cápsula para hacer reaccionar el sulfato existente en la muestra. El análisis se realiza por colorimetría, donde una onda de luz atraviesa una celda y determina la concentración del analito en mg/L.

b) **Rango de Concentración:** 0- 70 mg/l SO<sub>4</sub>

### 2. Aparatos.

a) Colorímetro HACH DR/2010

### 3. Reactivos.

a) Reactivo SulfaVer 4

### 4. Procedimiento

- Introducir el número de programa grabado para el Sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Pulsar: **680 ENTER**, la pantalla indicara: **Ajustar nm a 450**.
- Girar el dispositivo que regula la longitud de onda hasta que la pantalla indique: **450 nm**. Una vez que se indique la longitud de onda exacta, la pantalla indicara brevemente: **Muestra Cero** y a continuación: **mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>**.
- Llenar una cubeta limpia con 25 ml de muestra.
- Añadir el contenido de una capsula de reactivo SulfaVer 4 a la cubeta (muestra preparada). Agitar para mezclar. Si hay sulfato presente, aparecerá una turbiedad blanca.
- Pulsar: **SHIFT TIMER** y comienza un periodo de reacción de 5 minutos.
- Llenar otra cubeta (el blanco) con 25 ml de muestra. Cuando suene el temporizador, la pantalla indicara: **mg/L SO<sub>4</sub>**.
- Colocar el blanco en los soportes de medición. Cerrar la tapa.
- Pulsar: **ZERO**. La pantalla indicara: **Ajuste cero** y a continuación: **0. mg/L SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>**.
- Menos de 5 minutos después de que haya sonado el temporizador, colocar la muestra en los soportes de medición. Cerrar la tapa.
- Pulsar: **READ** la pantalla indicara: **Lectura**. A continuación aparecerá el resultado en mg/L de sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>).

<sup>1</sup> Adaptado de Standard Methods for the examination of water and wastewater.

### **Anexo A.5.3 Determinación de Espectros de absorción en la región de Infrarrojo (Equipo FT-IR)**

#### **1. Base Teórica**

Esta se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja.

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces.

La espectroscopia infrarroja tiene su aplicación más inmediata en el análisis cualitativo, debido a la correlación que existe entre los espectros y la estructura molecular.

#### **2. Procedimiento de Determinación de Pureza**

El análisis será realizado por un equipo de espectrofotometría FT-IR ALPHA T Bruker (ver Figura A.4.a) con ayuda de su software respectivo OPUS/DB 20080204/6.5.4 que establecerá las condiciones adecuadas para realizar la corrida. Uno de estos parámetros es el nivel de humedad que debe ser menor al 30% para no afectar la fiabilidad del análisis, el rango de trabajo general del equipo se mantiene en  $500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , por otra parte la resolución media del equipo se encuentra en  $1.65 \text{ cm}^{-1} - 2.00 \text{ cm}^{-1}$ .

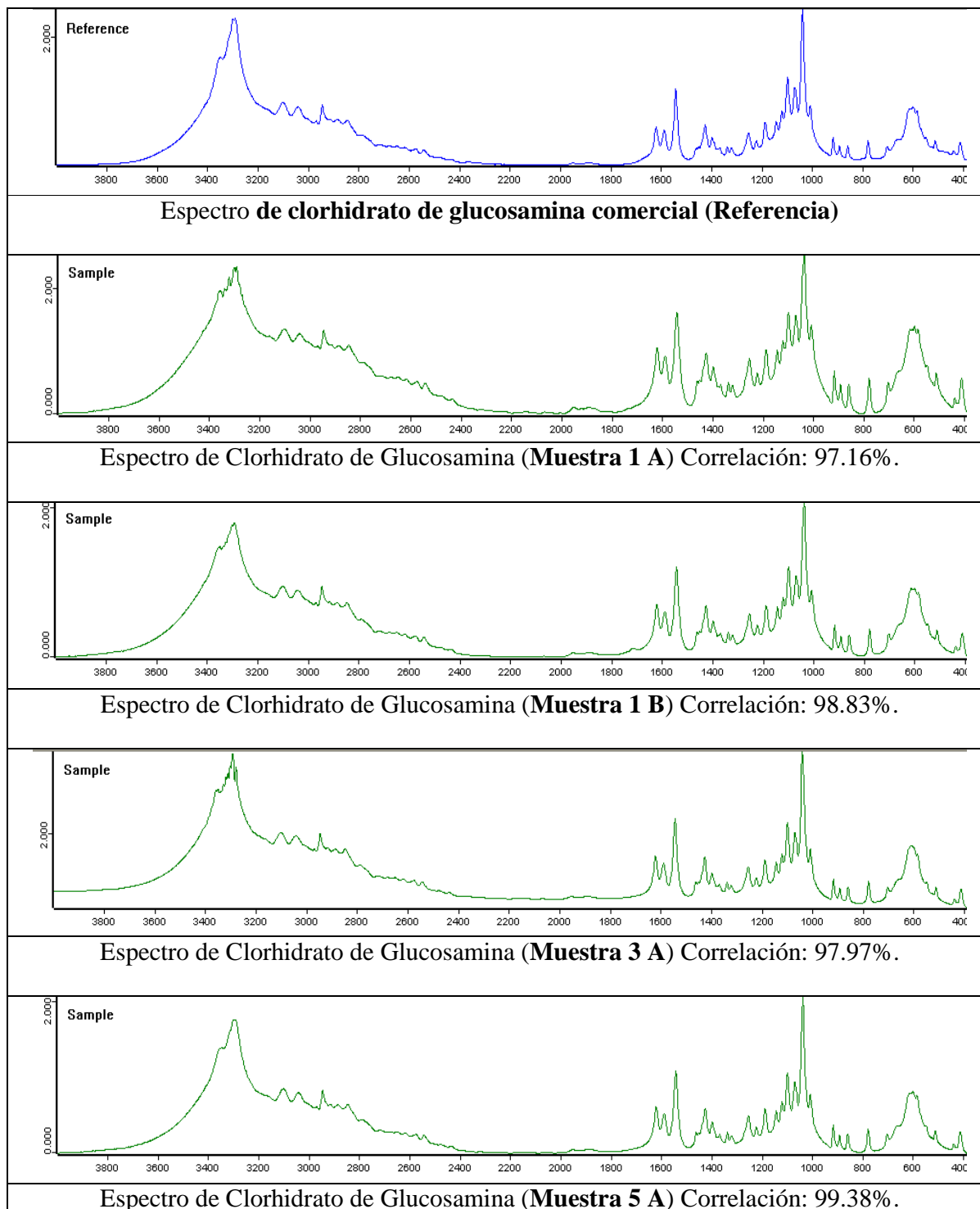
A continuación se prepara la muestra que implica triturar una cantidad de la mezcla con una sal especialmente purificada (usualmente bromuro de potasio) finamente (para remover efectos dispersores de los cristales grandes). Esta mezcla en polvo se comprime en una prensa de troquel mecánica para formar una pastilla translúcida a través de la cual puede pasar el rayo de luz del espectrómetro.

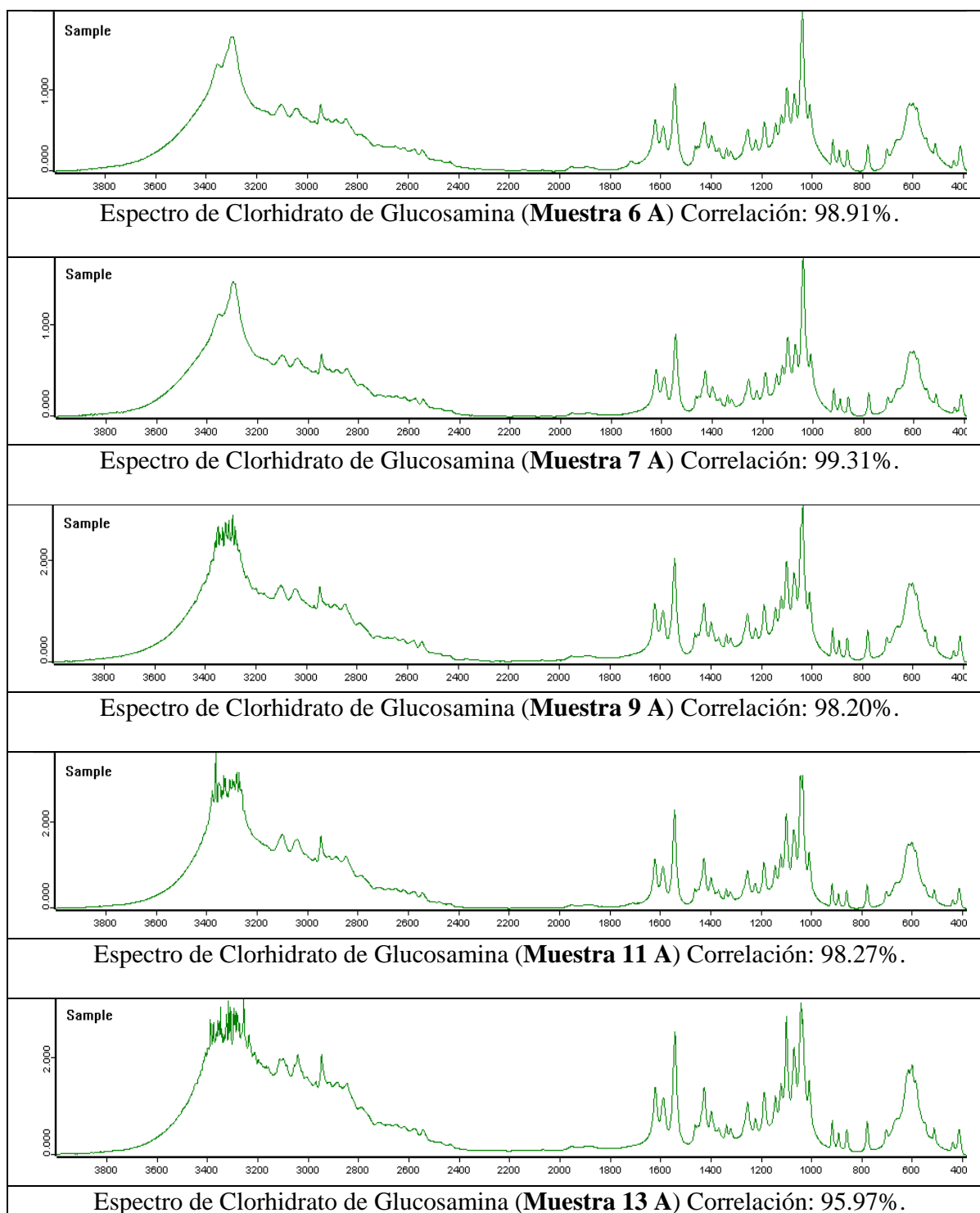
Es importante destacar que los espectros obtenidos a partir de preparaciones distintas de la muestra se verán ligeramente distintos entre sí debido a los diferentes estados físicos en los que se encuentra la muestra, ya que en algunos casos los agentes aglomerantes también absorben en IR mostrando bandas características.

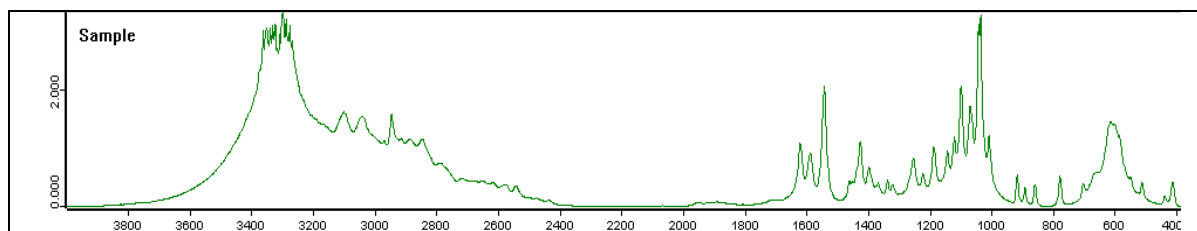
Se debe tener en cuenta que la cantidad de muestra usada en el análisis debe ser del 1-5% del KBR y este a su vez en dependencia de la traslucidez y constitución de la pastilla.

Finalmente la pastilla muestra es introducida en el instrumento como se observa en la figura A.4.b para comparar su espectro con una muestra patrón purificada previamente analizada y valorar la correlación entre ambas.

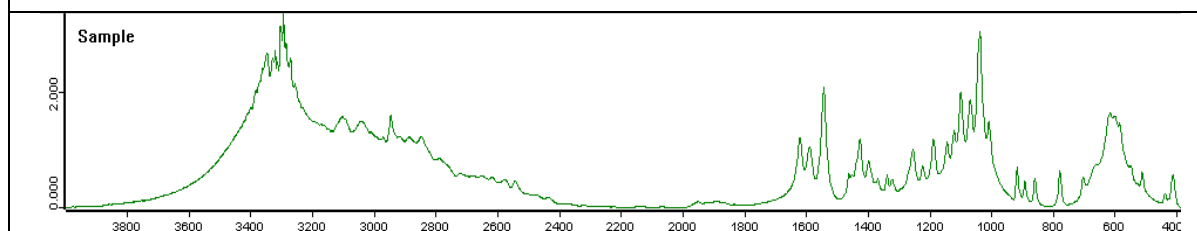
**Anexo A.6 Espectros de absorción en la región de Infrarrojo (Equipo FT-IR) de muestras de clorhidrato de glucosamina obtenidas a nivel de laboratorio y correlacionadas con la muestra de Referencia comercial.**



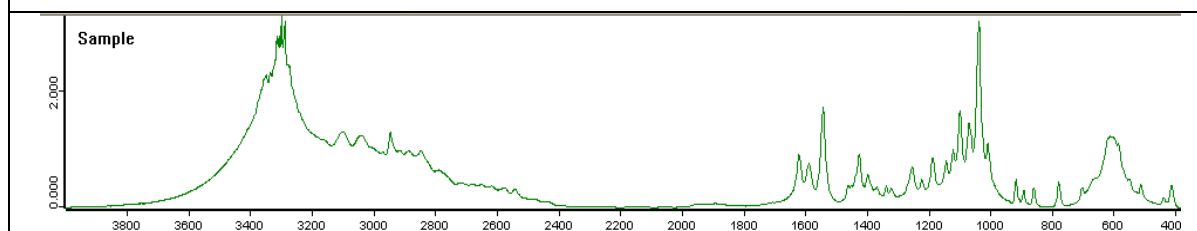




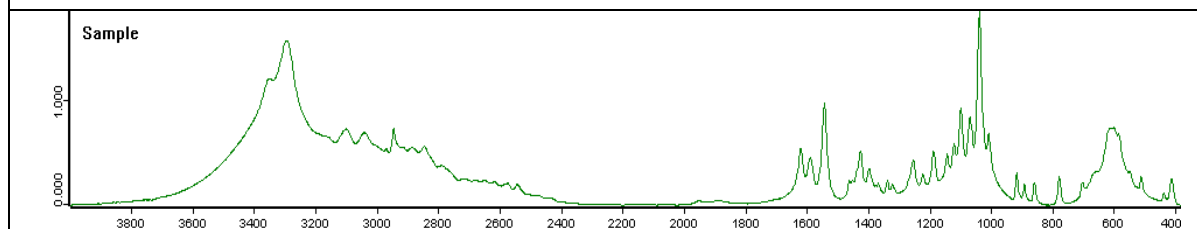
Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 15 A**) Correlación: 98.58%.



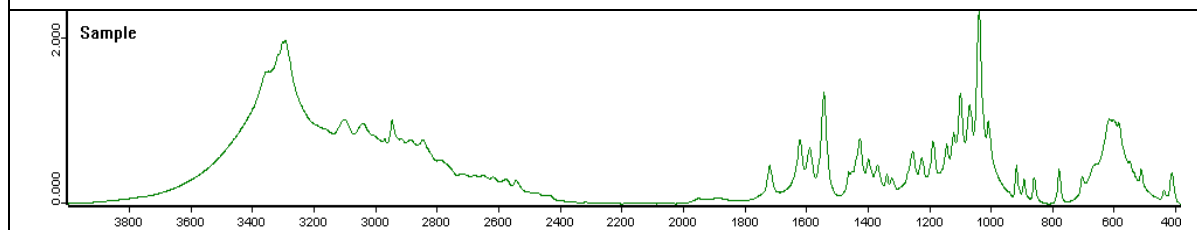
Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 17 A**) Correlación: 98.37%.



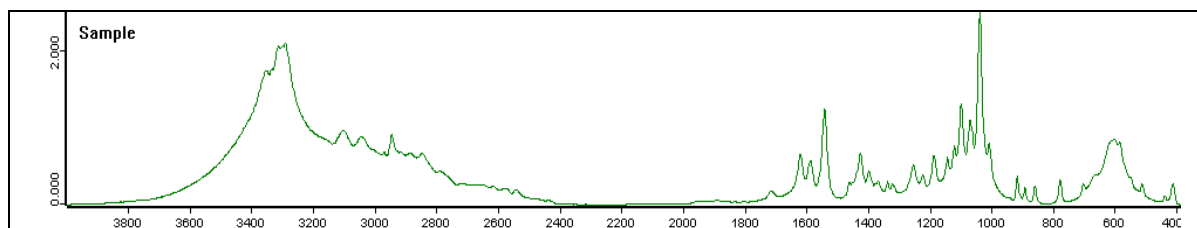
Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 18 A**) Correlación: 99.34%.



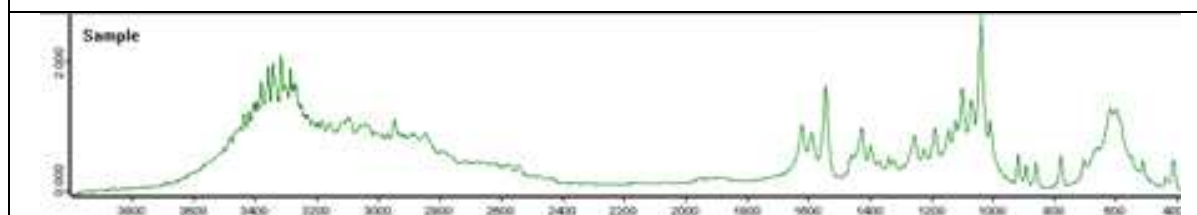
Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 19 A**) Correlación: 99.34%.



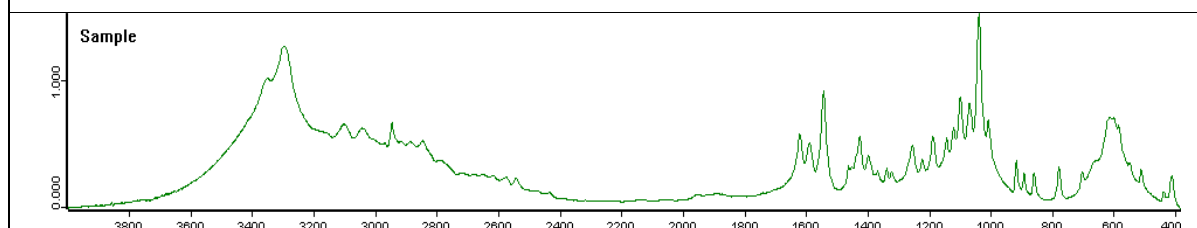
Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 20 A**) Correlación: 98.51%.



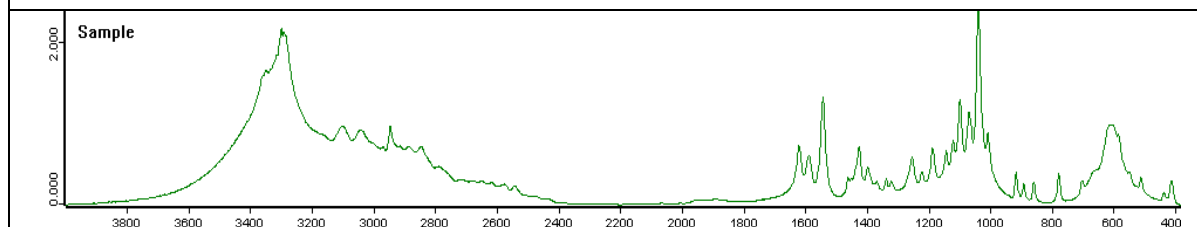
Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 20 B**) Correlación: 99.34%.



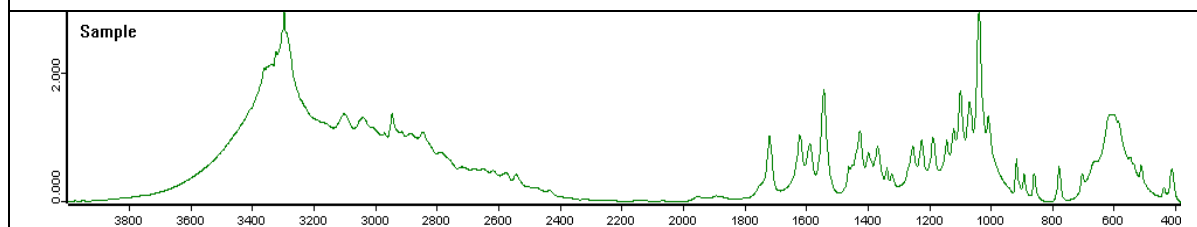
Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 21 A**) Correlación: 95.52%.



Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 23 A**) Correlación: 98.10%.

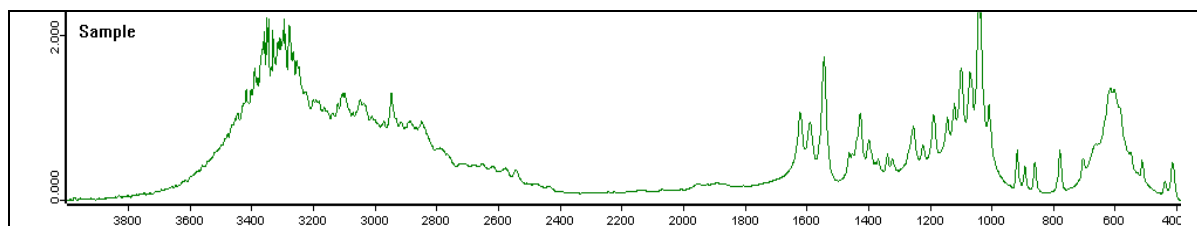
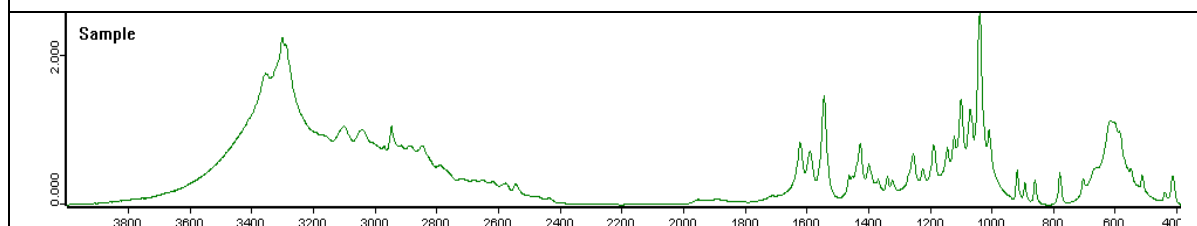
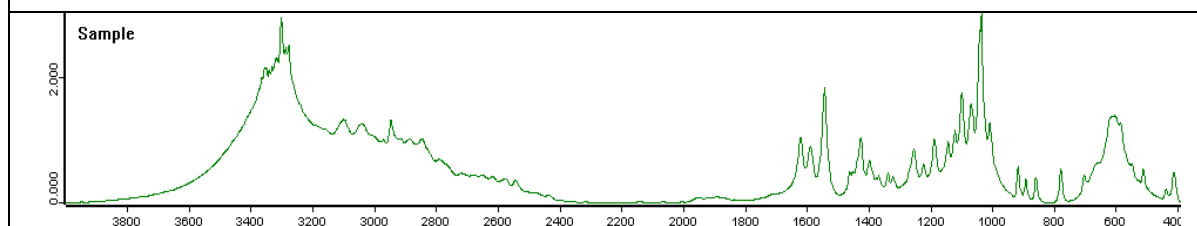
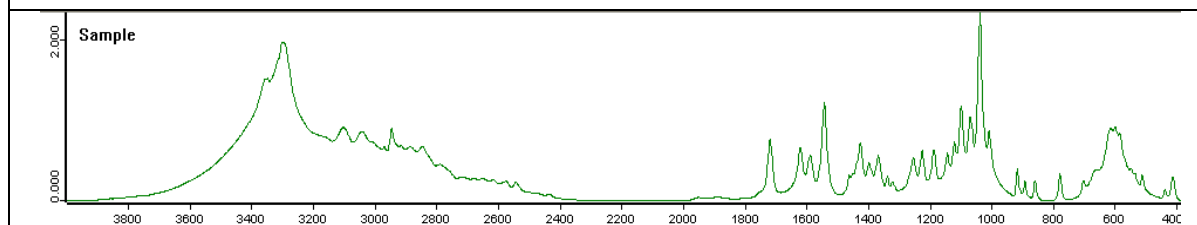
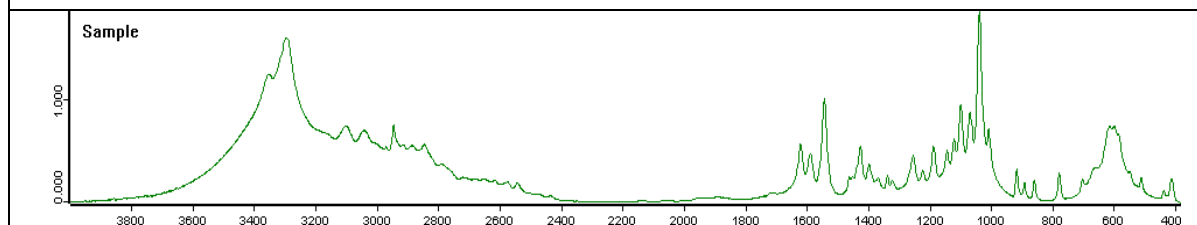


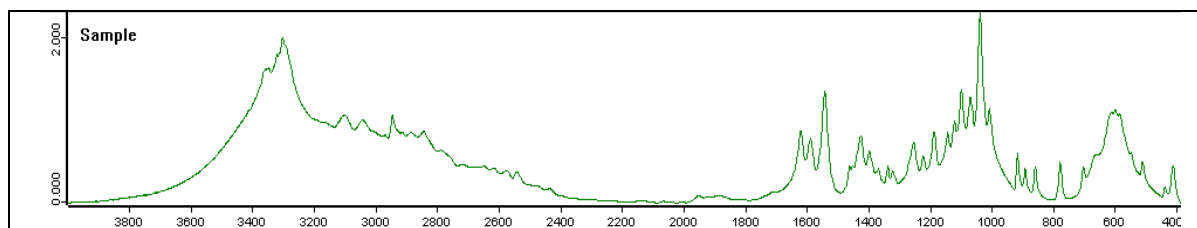
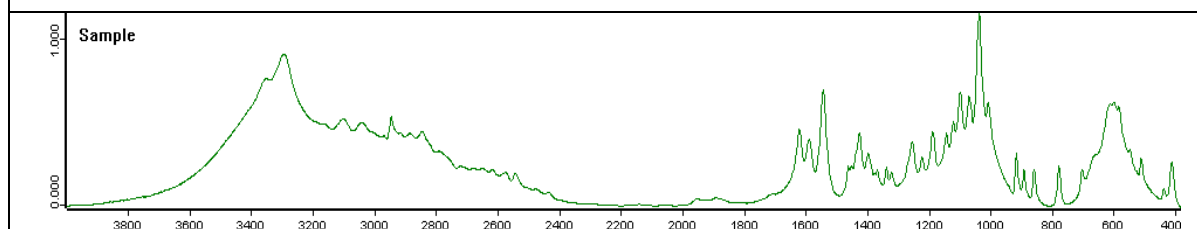
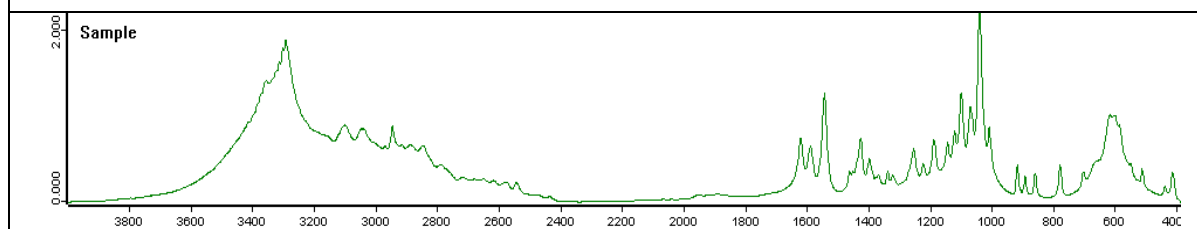
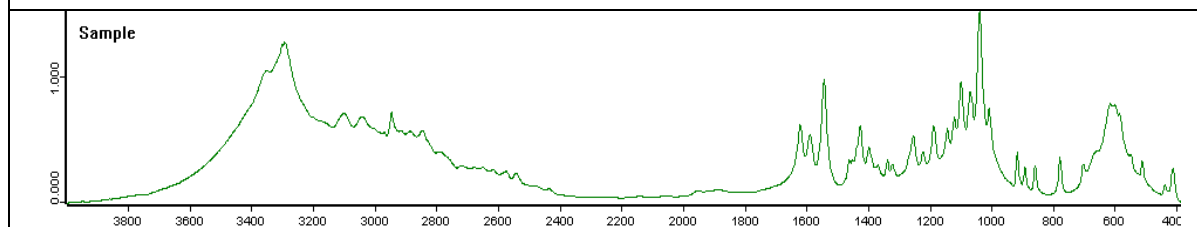
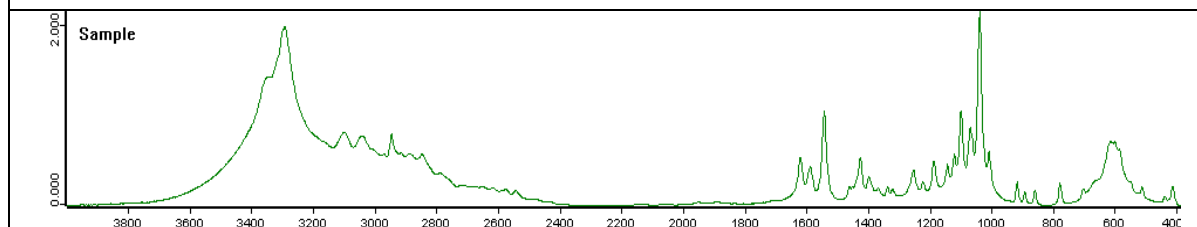
Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 24 A**) Correlación: 99.39%.

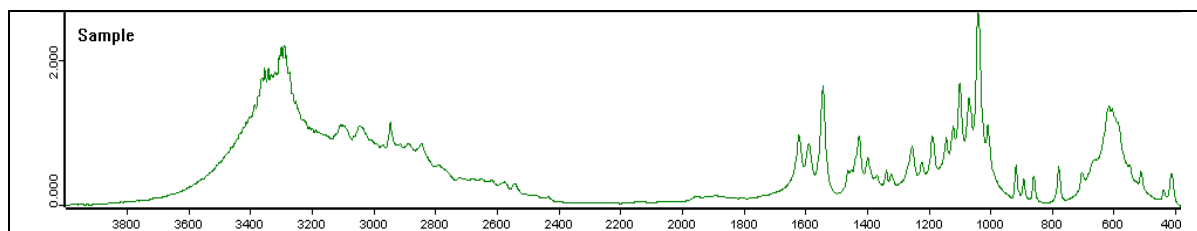
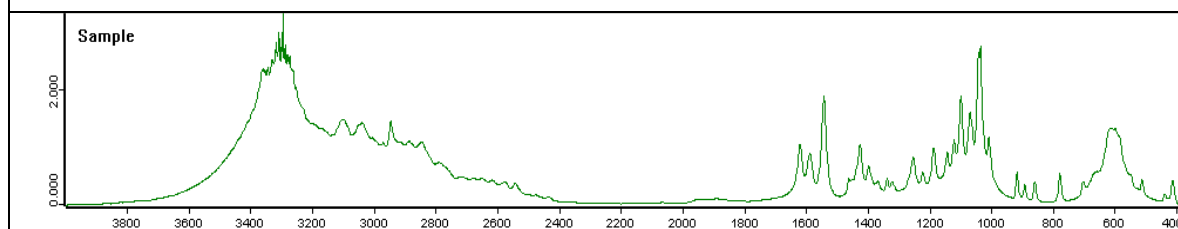
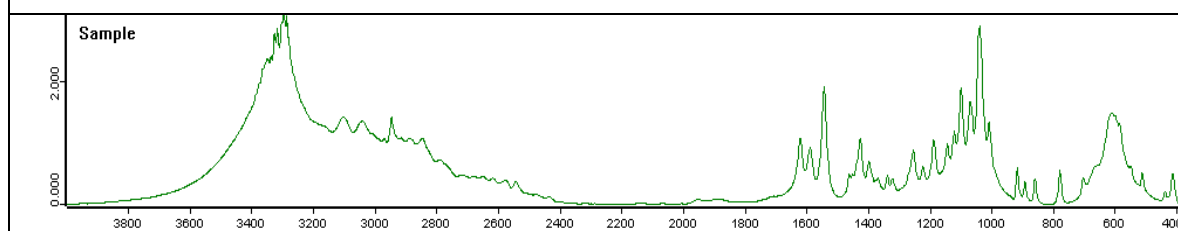
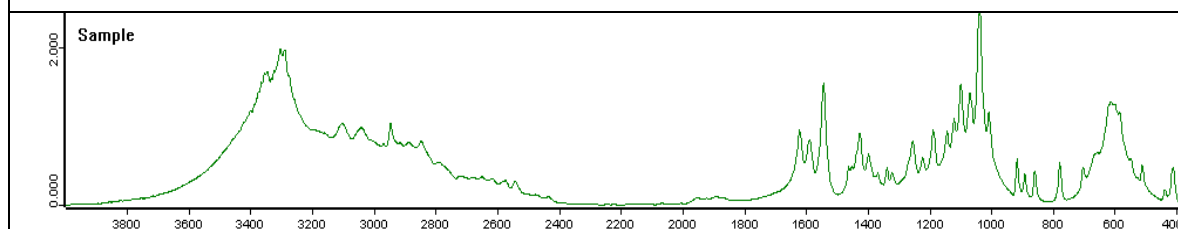
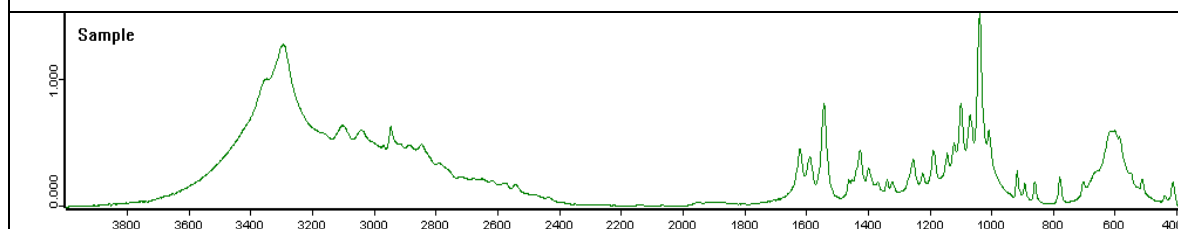


Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 25 A**) Correlación: 97.72%.



Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 27 A**) Correlación: 96.44%.Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 29 A**) Correlación: 98.94%.Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 30 A**) Correlación: 98.65%.Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 31 A**) Correlación: 98.17%.Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 31 B**) Correlación: 99.23%.

Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 33 A**) Correlación: 97.79%.Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 33 B**) Correlación: 96.35%.Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 35 A**) Correlación: 98.52%.Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 36 A**) Correlación: 97.54%.Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 37 B**) Correlación: 99.04%.

Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 39 B**) Correlación: 97.72%.Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 41 A**) Correlación: 98.67%.Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 42 A**) Correlación: 99.08%.Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 43 A**) Correlación: 96.85%.Espectro de Clorhidrato de Glucosamina (**Muestra 44 B**) Correlación: 99.24%.

